

ENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR BIOSYNTHESE DER BENZYLISOCHINOLIN-
UND PROTOBERBERIN-ALKALOIDE

THOMAS FRENZEL

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

ENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE DER
BENZYLISOCHINOLIN- UND PROTOBERBERIN-ALKALOIDE

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Thomas Frenzel
aus
München

Juli 1987

1.Referent: Prof. Dr. M.H. Zenk

2.Referent: Prof. Dr. J.Stöckigt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.7.87

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	15
1. Material	15
1.1 Pflanzliche Zellkulturen	15
1.2 Bakterien	15
1.3 Chemikalien	16
1.4 Geräte	17
2. Methoden	19
2.1 Herstellung zellfreier Enzympräparationen	19
2.1.1 Pflanzliche Zellen	19
2.1.2 Bakterien	19
2.2 Enzymtests	20
2.2.1 SAM-Synthetase	20
2.2.2 Methyltransferasen	21
2.2.3 Berberinbrücken-Enzym	22
2.2.4 (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase	24
2.3 Proteinbestimmung	24
2.4 Chromatographie	24
2.4.1 Dünnschichtchromatographie	24
2.4.2 HPLC	25
2.4.3 Synthese von Affinitätsmedien	27
2.4.4 Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen	28
2.5 Elektrophorese	29
2.5.1 Isoelektrische Fokussierung	29
2.5.2 Native Disc-Elektrophorese	30
2.5.3 SDS-Gelelektrophorese	30
2.6 Radioaktivitätsbestimmung	31
2.7 Radioimmunoassay zur Bestimmung von (R)- und (S)-Reticulin	31
2.8 Immobilisierung von Enzymen	32
III. Ergebnisse	34
1. Reinigung der ATP: L-Methionin S-Adenosyltransferase (SAM-Synthetase) und enzymatische Synthese von S-Adenosylmethionin (SAM)	34
1.1 Reinigung der SAM-Synthetase	35
1.2 Immobilisierung der SAM-Synthetase	38

1.2.1 Verschiedene Trägermaterialien	38
1.2.2 Optimierung der Immobilisierung an CPG-10 Glas	39
1.3 Eigenschaften der an CPG-10 immobilisierten SAM-Synthetase	40
1.3.1 Identifizierung des enzymatisch gebildeten Produktes	40
1.3.2 pH-Optimum	41
1.3.3 Produkthemmung durch SAM	42
1.3.4 Stabilität der SAM-Synthetase	44
1.4 Enzymatische Synthese von SAM	45
1.5 Synthese von $^{14}\text{CH}_3$ -SAM und C^3H_3 -SAM	48
2. SAM: 6-O-Methylaudanosolin 4'-O-Methyltransferase (4'OMT) ...	52
2.1 Verbreitung der 4'OMT in Zellkulturen	54
2.2 Kinetik der Bildung der 4'OMT in <u>Berberis koetineana</u>	55
2.3 Reinigung der 4'OMT aus <u>Berberis koetineana</u>	57
2.3.1 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel	57
2.3.2 Hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sephacel	59
2.3.3 Gelfiltration an TSK-Fraktogel	60
2.3.4 Affinitätschromatographie an SAH-AH-Sephacel	60
2.3.5 Ionenaustauschchromatographie an Mono Q	62
2.4 Identifizierung des Reaktionsproduktes der 4'OMT	67
2.5 Eigenschaften der 4'OMT	72
2.5.1 pH-Optimum	72
2.5.2 Temperatur-Optimum	73
2.5.3 Bestimmung des Molekulargewichtes	74
2.5.4 Isoelektrischer Punkt	76
2.5.5 Substratspezifität	77
2.5.6 Hemmstoffe	83
2.6 SAM: Norlaudanosolin 6-O-Methyltransferase (6 OMT)	87
2.6.1 Versuche zur Trennung von 4'OMT und 6 OMT	88
2.6.2 Eigenschaften der 6 OMT	90
2.6.2.1 Identifizierung des Reaktionsproduktes der 6 OMT	90
2.6.2.2 pH-Optimum	92
2.6.2.3 Substratspezifität	92
2.7 Stabilität der 4'OMT	94
3. SAM: Norreticuliculin N-Methyltransferase (NMT) aus Zellkulturen von <u>Berberis koetineana</u>	97
3.1. Trennung heterogener Formen der NMT aus <u>Berberis koetineana</u>	98

3.1.1 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel	99
3.1.2 Hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Superoose	101
3.1.3 Ionenaustauschchromatographie an Mono Q	102
3.2 Eigenschaften der heterogenen Formen NMT-I, NMT-II und NMT-III	105
3.2.1 Identifizierung des Reaktionsproduktes der NMT	105
3.2.2 pH- und Temperatur-Optimum	105
3.2.3 Molekulargewichte der NMT	107
3.2.4 Substratspezifität der NMT	108
3.2.5 K_m -Werte der NMT von 6-O-Methylnorlaudanosolin und Norreticulin	111
3.3 Immobilisierung der NMT	113
3.3.1 Präparative Isolierung von NMT aus <u>Berberis</u> <u>koetineana</u> Zellkulturen	113
3.3.2 Immobilisierung	114
3.3.3 Eigenschaften der immobilisierten NMT	116
4. Synthesen mit immobilisiertem Berberinbrücken-Enzym	120
4.1 Isolierung von Berberinbrücken-Enzym aus <u>Berberis</u> <u>beaniana</u> Zellkulturen	123
4.2 Isolierung von Berberinbrücken-Enzym aus <u>Corydalis</u> <u>vaginans</u> Zellkulturen	125
4.3 Immobilisierung von Berberinbrücken-Enzym	128
4.4 Eigenschaften des an CPG-10 immobilisierten Berberin- brücken-Enzyms	130
4.4.1 Identifizierung des Reaktionsproduktes	130
4.4.2 pH-Optimum	131
4.4.3 Stabilität des immobilisierten Berberinbrücken-Enzym	132
4.5 Enzymatische Synthese von Dehydroscoulerin mit immobili- siertem Berberinbrücken-Enzym und (S)-Tetrahydroprotober- berin Oxidase	134
4.6 Enzymatische Synthese von (S)-(^{13}C -8)-Scoulerin mit immobilisiertem Berberinbrücken-Enzym	137
5. Enzymatische Synthesen radioaktiv markierter Alkaloide	140
5.1 Synthese von ^3H - und ^{14}C - markiertem Reticulin	141
5.2 Synthese von (R)- und (S)-($6\text{-O}^{14}\text{CH}_3$)-Norreticulin	143

6. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von Berberinbrücken- Enzym und Berberin Synthase mit Hilfe chiraler Methylgruppen	146
6.1 Einführung in die Arbeitsweise mit chiralen Methylgruppen	147
6.2 Bestimmung der Konfiguration von chiralen Methylgruppen ..	148
6.3 Darstellung möglicher Mechanismen des Berberinbrücken- Enzyms und der Berberin Synthase	152
6.4 Bestimmung der Konfiguration der chiral markierten Methylengruppen in Scoulerin und Berberin	155
6.5 Synthese von (Methyl-R)- und (Methyl-S)-SAM	157
6.6 Enzymatische Synthese von Reticulin, das mit chiralen Methylgruppen markiert ist	159
6.7 Bestimmung der Konfiguration der durch 6 OMT und NMT übertragenen Methylgruppen	161
6.8 Untersuchungen zur Bildung der 2,3-Methylendioxybrücke in Berberin	163
6.9 Untersuchungen zur Bildung der Berberinbrücke	167
IV. Diskussion	170
V. Zusammenfassung	191
VI. Literaturverzeichnis	194

Verwendete Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BBE	Berberinbrücken-Enzym
CI	Chemische Ionisation
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid HCl
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß Ionisation
FG	Frischgewicht
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
LS-Medium	Medium nach LINSMAIER und SKOOG, 1965
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NMT	Norreticulin N-Methyltransferase
6 OMT	Norlaudanosolin 6-O-Methyltransferase
4'OMT	(S)-6-O-Methylaudanosolin 4'-O-Methyltransferase
RIA	Radioimmunoassay
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
STOX	(S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase
TCA	Trichloressigsäure
TG	Trockengewicht
Tricin	N-(tris-(hydroxymethyl)-methyl)-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

I. Einleitung

Die Gruppe der Isochinolin-Alkaloide stellt mit mehr als 2000 bekannten Vertretern eine der umfangreichsten, aber auch strukturell vielfältigsten Gruppe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe dar, die darüber hinaus relativ weit im Pflanzenreich verbreitet ist (SHAMMA, 1972; BISSET, 1985). Im Laufe der Zeit hat sich in der Volks- oder Erfahrungsmedizin der Gebrauch verschiedener isochinolinalkaloidhaltiger Pflanzen als Heilmittel in einem Trial-and-Error Verfahren durchgesetzt. Durch archäologische Funde und alte Schriften aus dem Mittelmeergebiet, ist die Verwendung von Opium schon lange vor unserer Zeitrechnung wohl dokumentiert (BISSET, 1985). Auch in der indischen und fernöstlichen Heilkunst werden solche alkaloidführenden Drogen, etwa die japanische "Shin-I" aus Magnolia salicifolia (KIMURA et al., 1983), oder Aconitum japonicum (KOSUGE et al., 1978), Annona squamosa (WAGNER et al., 1980), sowie Thalictrum faberi aus China (LIN et al., 1983), um nur einige wenige zu nennen, seit langer Zeit eingesetzt. Erst seit Beginn des 19. Jahrhunderts aber wurden die ersten Reinstoffe als wirksame Prinzipien der Drogen isoliert. Die populärsten Beispiele sind sicher die Opium-Alkaloide Morphin (Sertürner 1806), Codein (Robiquet 1832), Papaverin (Merck 1848) und das Noscapin, früher als Narcotin bezeichnet (Robiquet 1817) (MOTHES, 1984).

Mit den isolierten und später auch synthetisierten, reinen Alkaloiden konnte die Wechselwirkung mit dem menschlichen Organismus immer genauer untersucht werden. Diese Wirkungen der Isochinolin-Alkaloide sind mindestens so mannigfaltig wie ihre diversen Strukturtypen, aber das pharmakologisch, medizinisch nutzbare Potential dieser Stoffklasse ist sicher noch nicht vollständig erfaßt.

Die Opium-Alkaloide bilden hier eine positive Ausnahme. (vergl. z.B. MUTSCHLER 1981; LINDNER, 1985). Das Morphin gehört zu den stark wirksamen Analgetika mit Angriff auf die



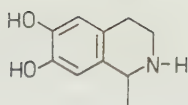
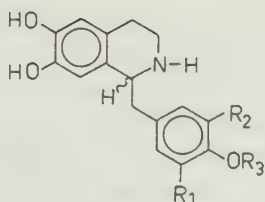
Opiat-Rezeptoren des ZNS. Zentral sind auch sein hemmender Effekt auf das Atem- und Hustenzentrum und die Veränderung der Stimmungslage, die oft euphorischer Art ist und dadurch in die psychische Abhängigkeit führt. Die dem Morphin den Namen gebende Wirkung der Erzeugung eines tiefen Schlafes ist heute die unbedeutendste und tritt auch erst bei hoher Dosierung auf. Peripher führt Morphin zu Spasmen des Gastrointestinaltraktes und der Sphinkteren.

Codein zeigt diese Wirkungen in deutlich abgeschwächter Form und wird heute nur noch als Antitussivum verwendet, dessen Suchtpotential fast zu vernachlässigen ist. Auch Noscapin wird, häufig zusammen mit Codein, als Hustenblocker angewendet.

Papaverin dagegen, ist ein direkt an der glatten Muskulatur angreifendes Spasmolytikum, das, auch kombiniert mit den parasympatholytischen Tropan-Alkaloiden, bei Koliken eingesetzt wird.

Das Opium selbst, als ein natürliches Kombinationspräparat, zeigt durch das zum Teil auch antagonistische Zusammenspiel dieser und einer Reihe weiterer Bestandteile eine gute Wirkung bei Diarrhoe, wird aber nur noch bei dieser Indikation den Reinsubstanzen vorgezogen.

Wenn die Benzyltetrahydroisochinolin-Alkaloide bei uns in der Therapie auch keine Rolle spielen, so gibt es doch Untersuchungen zu ihrer Pharmakologie. Das nicht methylierte Norlaudanosolin, in der Literatur auch als Tetrahydropapaverolin bezeichnet, ist ein schwaches β -Sympathomimetikum, im Wirkprofil etwa vergleichbar mit Isoprenalin (NOTT, 1978), und in Rezeptorbindungstests ein potenter Dopaminantagonist (BRITTON et al., 1982). Salsolinol und Norlaudanosolin werden auch als Säuger-Alkaloide diskutiert (COLLINS, 1983), die von Alkoholabhängigen und von mit L-Dopa behandelten Parkinson Patienten (SANDLER et al., 1973) gebildet werden, weil die im Überschuß produzierten Acetaldehyd und Dopaldehyd nicht abgebaut werden können, und mit Dopamin möglicherweise nichtenzymatisch zu den Alkaloiden kondensieren. Möglicherweise trägt Norlaudanosolin auch zu einer



Norcoclaurin: $R_1 = R_2 = R_3 = H$
 Norlaudanosolin: $R_1 = OH, R_2 = R_3 = H$
 Trimethoquinol: $R_1 = R_2 = OCH_3, R_3 = CH_3$

Salsolinol

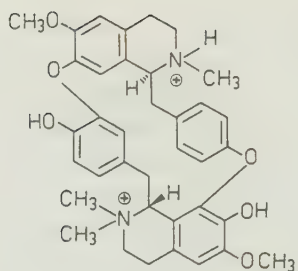
Abb. 1

Abhängigkeit bei, denn es steigert das Alkoholverlangen bei Mäusen (MYERS et al., 1978).

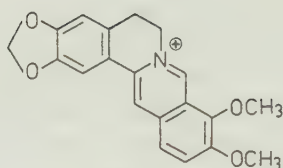
Norcoclaurin wurde aus Aconitum japonicum, das in China als Herztonikum und Entwässerungsmittel verwendet wird (KOSUGE et al., 1976) und aus der ebenfalls als Tonikum verwendeten Annona squamosa isoliert. Es bewirkt eine intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen und wirkt damit positiv inotrop. Daneben hat es eine deutliche β_2 -sympathomimetische Wirkung die als Bronchospasmolytikum mit geringer Nebenwirkung auf das Herz genutzt wird (ZHENG et al., 1982; WAGNER et al., 1980).

Eine rein synthetische, aber den natürlich vorkommenden Alkaloiden recht nahe stehende Verbindung ist das Trimethoquinol, das eine inhibierende Wirkung auf die Blutplättchenaggregation ausübt, und damit der Thrombenbildung vorbeugt. Ebenso wie das Norcoclaurin ist es daneben ein gutes β_2 -Sympathomimetikum und als Bronchospasmolytikum auf dem Markt. (SATO et al., 1980; PHARM. STOFFLISTE).

Die Ähnlichkeit der Benzylisochinoline zur Ausgangsverbindung Dopamin und zu Noradrenalin sind die Ursache für ihre unterschiedlichen Einflüsse auf das zentrale und sympathische Nervensystem. So sind die Auswirkungen, die die verschiedenen Methylierungen der phenolischen Hydroxylgruppen



(+)-Tubocurarin



Berberin

Abb. 2

und andere Derivatisierungen und Strukturveränderungen nach sich ziehen, vor allem in Bindungsstudien mit α -, β_1 -, β_2 -, Dopamin-, Opiat- und Benzodiazepinrezeptoren untersucht worden, oft auch mit dem Ziel, auf diese Weise Auskunft über die Bindungsstelle des Rezeptors selbst zu erhalten (SHEP-PARD et al., 1977; NIMITKITPAISAN et al., 1978; BROSSI et al., 1980; NIMIT et al., 1983).

Unter den Bisbenzylisoquinolinen wird vor allem das quaternäre Curare-Alkaloid Tubocurarin als stabilisierendes, peripheres Muskelrelaxans in der Chirurgie genutzt.

Aus der Gruppe der Protoberberine gibt es ebenfalls nur einen Vertreter der marktfähig geworden ist - das Berberin. Wegen seiner antiphlogistischen und antimikrobiellen Wirkung und wegen der schlechten Resorption des geladenen Moleküls durch Schleimhäute, wird es bei Bindehautreizung am Auge und Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes verwendet. Neben einer Reihe eher unerwünschter Wirkungen auf das Herz-Kreislauf-System in Tiermodellen (PREININGER, 1975) wird auch von einer Steigerung des Galleflusses bei an Gallenentzündung leidenden Patienten berichtet (TUROVA et al., 1964).

Es zeigt sich, daß trotz der großen Struktur- und Wirkungs-

vielfalt der Isochinolin-Alkaloide nur wenige den Weg über das Tierexperiment hinaus in die Therapie gefunden haben, was oft auf ihre Toxizität und die diesbezüglich hohen Anforderungen moderner Arzneimittelgesetzgebung zurückzuführen ist. Aber sie haben den pharmazeutischen Chemikern oft als Leitbilder gedient, um aus ihren Strukturen wirksamere, aber weniger toxische Verbindungen abzuleiten. Neben dem schon erwähnten Trimethoquinol, stand so das Morphin, nachdem sein wirksamer Strukturteil bestimmt worden war, Pate bei einer ganzen Palette synthetischer, stark wirksamer Analgetika. Die erhoffte Trennung zwischen Analgesie und Suchtpotential ließ sich dadurch allerdings nicht erreichen. Vom Tubocurarin leiten sich einige, strukturell wesentlich einfachere Muskelrelaxantien ab, die nur den notwendigen Abstand zwischen den geladenen Polen garantieren. Aber auch dimere Benzylisochinoline wie Laudexium oder das schnell eliminierbare und damit leicht steuerbare Atarcurium leiten sich vom Tubocurarin ab.

Die Gemeinsamkeit dieser scheinbar bunt zusammengewürfelten Alkaloidgruppe, in der bei vielen Vertretern der namensgebende Isochinolinteil oft nicht mehr erhalten ist, rührt von ihrem gemeinsamen biosynthetischen Ursprung her. In zahlreichen Fütterungsexperimenten an ganzen Pflanzen wurden Cocclaurin und Reticulin als direkte Vorläufer und zentrale Verzweigungspunkte erkannt (SHAMMA, 1972). Schon früh wurde zur Biosynthese dieser Benzyltetrahydroisochinoline vorgeschlagen, daß eine biologische Mannich- oder Pictet-Spengler Reaktion zwischen den aus Tyrosin abgeleiteten Phenethylamin und Phenylacetaldehyd stattfindet (WINTERSTEIN und TRIER, 1910; PICTET und SPENGLER, 1911). Ende der fünfziger Jahre wurde durch Fütterungsexperimente mit radioaktiv markierten Vorstufen gezeigt, daß die Aminosäure Tyrosin tatsächlich ein allgemeiner Precursor dieser Alkaloide ist (KLEINSCHMIDT et al., 1959; BATTERSBY et al., 1959). Damit konnte ein Teil dieser alten Hypothese bestätigt werden, die Frage nach dem Reaktionspartner, der den Ringschluß zum Isochinolin-Skelett

bewirkt, blieb aber umstritten. Bei einigen der einfachen Isochinolinen stellte sich zweifelsfrei die entsprechende α -Ketosäure und nicht der Aldehyd als Carbonylkomponente heraus, wobei die entstehende Isochinolin-1-carbonsäure anschließend decarboxyliert wird (KAPADIA et al., 1970). Auch bei den Benzylisochinolinen sprach zunächst, nach Fütterung des entsprechenden Phenylpyruvats und Isolierung der entstandenen Norlaudanosolin-1-carbonsäure, alles für diesen Reaktionsweg (SCOTT et al., 1978; BHAKUNI et al., 1977).

Um aber die genauen biosynthetischen Vorgänge in der Pflanze offenzulegen, ist es unerlässlich, sie auf enzymatischem Niveau zu untersuchen und das, wenn möglich, auch unter Berücksichtigung der Kompartimentierung dieser Vorgänge in der Zelle und der Poolgrößen der daran beteiligten Stoffe. Denn nur so können die Einzelschritte, aus denen sich die Biosynthese, wie sie "von außen" (z.B. Fütterungen) zu beobachten ist, zusammensetzt, genau untersucht werden, und Auskunft erhalten werden, über die tatsächlichen Reaktionspartner und die kinetischen Verhältnisse ihrer Umsetzungen. Aber auch das kann noch zu Mißverständnissen führen, wenn nicht auch die strenge Einteilung der Zelle in ihre Reaktionsräume berücksichtigt wird, die für die zeitliche Abfolge von Reaktionsketten von Bedeutung ist.

Als sehr vorteilhaft hat sich dabei die Verwendung von Zellkulturen der Gattung Berberis - im Gegensatz zu ganzen Pflanzen - als Ausgangsmaterial zur Enzymisolierung (Suspensionskulturen) oder zu Fütterungsversuchen (Kalluskulturen) erwiesen (ZENK et al., 1985; RÜFFER, 1985). Natürlich findet der Einsatz von Zellkulturen dort seine Grenzen, wo durch die Unterbindung der Zelldifferenzierung auch der Sekundärstoffwechsel blockiert ist (LUCKNER und DIETRICH, 1984). So ist von Papaver somniferum (WIECZOREK, 1985) und auch von Digitalis lanata (KARTNIG, 1977) Zellkulturen bekannt, daß sie nicht die begehrten Inhaltsstoffe ihrer Elternpflanzen produzieren.

Für den Biosyntheseweg aus dem Primärstoffwechsel heraus zu den Benzylisochinolin, insbesondere dem Reticulin, und

weiter zu dem Protoberberin Berberin sind die entsprechenden Untersuchungen auf der Stufe der Enzyme schon weit fortgeschritten. Die Bereitstellung der fernen Vorstufen Dopamin und der möglichen Carbonylkomponenten 4-Hydroxy- bzw. 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd und der entsprechenden Pyruvate aus Tyrosin gelingt durch das Zusammenspiel von Phenolasen (Einführung der 3-Hydroxygruppe), Decarboxylasen (Überführung der Aminosäuren in ihre Amine), Monoaminoxidasen (Oxidation der Amine zu Aldehyden) und Transaminasen (Oxidation der Aminosäuren zu α -Ketosäuren). Diese Enzyme konnten in Zellkulturen verschiedener Berberis Arten nachgewiesen werden (RÜFFER und ZENK, 1987).

Als erstes Enzym im Biosyntheseweg zu den Isochinolininen wurde die Norlaudanosolin-Synthase (1; die Nummerierung bezieht sich auf Abb. 3) gereinigt und charakterisiert (RÜFFER et al. 1981; SCHUMACHER et al., 1983). Dieses Enzym katalysiert stereospezifisch die Bildung von (S)-Norlaudanosolin bzw. (S)-Norcoclaurin und setzt ausschließlich die beiden Phenylacetaldehyde um, und nicht die Phenylpyruvate, womit die Unklarheit über die Identität des C_6C_2/C_3 -Precursors endgültig entschieden ist.

Das Norlaudanosolin muß an drei Stellen methyliert werden um zum Reticulin zu gelangen. Ein in Position 6 (2) und ein am Stickstoff (4) methylierendes Enzym konnten u.a. aus Berberis Zellkulturen angereichert werden (RÜFFER et al., 1983a; WAT et al., 1986). Beide Methyltransferasen sind nicht stereoselektiv bezüglich des Asymmetriezentrums C-1. Das Enzym für die Einführung der dritten Methylgruppe in der Stellung 4' (3) ist bislang nicht beschrieben worden und soll Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein. Auf Grund von Ergebnissen aus Fütterungen an ganzen Pflanzen wurde postuliert, daß es eine festgelegte Reihenfolge für den Ablauf dieser Methylierungen gibt, so wie es auch in anderen Biosynthesewegen beobachtet wird (IBRAHIM et al., 1987; PAUL, 1973). Danach sollen zuerst gleichberechtigt die beiden Positionen am Sauerstoff methyliert, und das entstandene Norreticulin dann zum Reticulin umgesetzt werden (BHAKUNI et al., 1977). Auch

mit dieser Problematik wird sich diese Arbeit beschäftigen.

Neuere Arbeiten von STADLER et al. (1987) und LÖFFLER et al. (1987) zeigen neben diesem, sozusagen klassischen Biosyntheseschema, noch eine andere, möglicherweise sogar bevorzugte Route zum Reticulin. Ausgehend von der Entdeckung, daß (S)-Cocclaurin und vor allem (S)-N-Methylcocclaurin genauso effektiv wie (S)-Reticulin von Berberis stolonifera Kalluskulturen in Jatrorrhizin (STADLER, 1986) und andere Alkaloidstrukturen eingebaut werden, und der Tatsache, daß Tyramin etwas besser als Dopamin in den Benzylteil der Alkaloide eingebaut wird (ZENK et al., 1985), wird (S)-Norcocclaurin und nicht (S)-Norlaudanosolin als biosynthetisch erster Vertreter der Benzylisochinoline vorgeschlagen. Eine Enzymaktivität (5), die Cocclaurin zu dem entsprechenden Norlaudanosolin Derivat hydroxyliert, wurde von LÖFFLER (pers. Mitteilung) bereits aus Berberis Zellkulturen isoliert.

Das Reticulin weist durch seine freien Hydroxylgruppen in Position 7 und 3' die idealen Voraussetzungen auf, um im Rahmen einer Phenoloxidation eine ganze Reihe intra- und intermolekulare Verknüpfungen einzugehen. Obwohl das Prinzip der Phenolkupplung für die Entstehung neuer Strukturen von elementarer Bedeutung zu sein scheint, wird über den Mechanismus dieses Reaktionstyps noch viel spekuliert und ist wenig bekannt (BARTON und COHEN, 1957; STEFFENS, 1984; CORDELL, 1981). Nur das weiter unten noch zu besprechende Berberinbrücken-Enzym und ein nicht näher charakterisiertes Enzym aus Papaver somniferum (HODGES und RAPOPORT, 1982), das Reticulin zu dem Morphinandienon Salutaridin cyclisiert,

Biosynthese der Protoberberin Alkaloide. 9 Enzyme, die die Reaktionen bis zum Berberin katalysieren, sind aus pflanzlichen Zellkulturen isoliert worden.

1 Norlaudanosolin-Synthase, 2 Norlaudanosolin 6-O-Methyltransferase, 3 6-O-Methylaudanosolin 4'-O-Methyltransferase, 4 Norreticulin N-Methyltransferase, 5 Hydroxylase, 6 Berberinbrücken-Enzym, 7 Scoulerin 9-O-Methyltransferase, 8 S-Tetrahydroprotoberberin Oxidase, 9 Berberin Synthase. Die Reaktion zum Jatrorrhizin ist auf enzymatischem Niveau nicht untersucht.

Abb. 3

stellen zwei Ansätze dar, das Phänomen auf enzymatischer Ebene zu untersuchen.

Die Entscheidung, in welche Richtung das Reticulin weiter umgesetzt wird, hängt nun maßgeblich von seiner Konfiguration an C-1 ab. Die Umwandlung des wahrscheinlich primär gebildeten (S)-Enantiomeren in seine (R)-Form, läuft offenbar über das 1,2-Dehydroreticulिन (BATTSBY et al., 1965; BORKOWSKY et al., 1977). Ein entsprechend arbeitendes Enzymsystem konnte bislang aber nicht gefunden werden. Das (R)-Reticulin schlägt dann den Weg zu den Morphinanen ein, während (S)-Reticulin u.a. in die Protoberberine eingeht. Das dafür notwendige, stereoselektive Enzym wurde von STEFFENS (1984) zur Homogenität gereinigt, und nach seiner Funktion Berberinbrücken-Enzym (6) genannt. Die N-Methylgruppe wird dabei als C-8 in das nun viergliedrige Ringsystem des (S)-Scoulerins integriert.

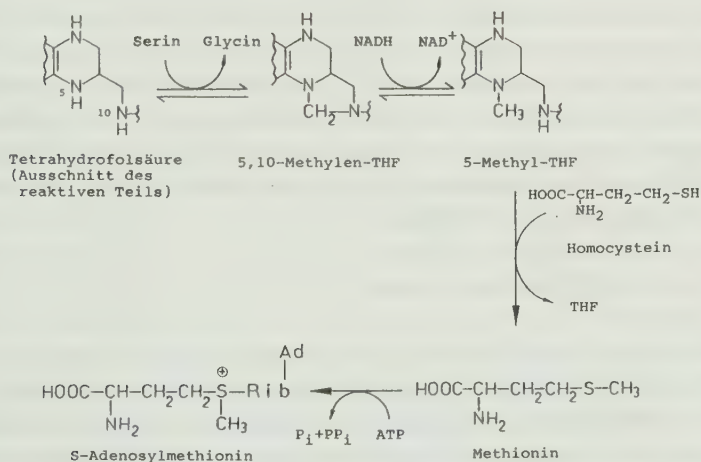
Erneut kommt es zu einer, diesmal sehr regio- und stereoselektiven Methylierung (7) in Stellung 9 (MÜMLER et al., 1985). Es entsteht Tetrahydrocolumbamin, das durch die von AMANN (1986) beschriebene S-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX) (8) im Ring C zu Columbamin oxidiert wird.

Der letzte enzymatische Schritt zum Berberin, die Bildung der Methylenedioxybrücke am Ring A, wird durch die Berberin Synthase (9) (RÜFFER und ZENK, 1985) katalysiert. Berberin stellt allerdings nicht den Endpunkt einer Synthesekette dar, sondern wird seinerseits durch Spaltung der Methylenedioxybrücke in Jatrorrhizin überführt (BEECHER und KELLEHER, 1983; RÜFFER et al., 1983), das in den meisten Berberis Zellkulturen als Hauptalkaloid auftritt (CASSELS et al., 1987; HINZ und ZENK, 1981). Wenn auch die Enzymatik dieses Schrittes noch nicht geklärt ist, so ist der lange Weg vom Tyrosin bis in die späten Stadien der Protoberberin Biosynthese auf enzymatischer Ebene gut verstanden.

Ein Grund für den Variantenreichtum unter den Alkaloiden liegt in den vielfältigen Methylierungsmustern phenolischer Strukturen, denen sicher auch regulatorische Funktionen

zufallen, etwa in Hinsicht auf Lenkung der Phenolkupplungen durch Desaktivierung bestimmter Positionen im Ringsystem (SPENSER, 1966). Durch zahlreiche in-vivo und in-vitro Versuche hat sich S-Adenosylmethionin (SAM) auch im Sekundärstoffwechsel als universeller Überträger der Methylgruppe herausgestellt.

Die C₁-Einheit stammt letztlich aus dem Primärstoffwechsel, in dem die Tetrahydrofolsäure (THF) der zentrale Akzeptor und Donator für C₁-Elemente verschiedener Oxidationsstufen ist. Die Übertragung einer Hydroxymethylgruppe von dem aus der Glycolyse abgeleiteten Serin ist die wichtigste Reaktion zur Bildung der 5,10-Methylen-THF. Sie wird zur 5-Methyl-THF reduziert und dient so als Methyl-Donator für die Entstehung von Methionin aus Homocystein (TAYLOR und WEISSBACH, 1973). Daneben kann die Methylgruppe aber auch in einem Recycling Verfahren von Betain und S-Methylmethionin sowie Dimethyl-β-propiothetin auf Homocystein übertragen werden, ohne daß die



Biogenese der Methylgruppe in S-Adenosylmethionin (SAM).

Abb. 4

Methylgruppen dabei aber de novo synthetisiert werden würden, und letztlich auch aus dem SAM stammt (MAW, 1981).

Der Dreh- und Angelpunkt in dem entstehenden SAM ist das Schwefelatom. Es stammt in Pflanzen und Microorganismen aus der Reduktion von Sulfat, und wird als Sulfid auf Serin übertragen. Das entstandene Cystein gibt seine SH-Gruppe über die gemeinsame Zwischenstufe Cystathionin an Homoserin weiter, so daß Homocystein entsteht. Höhere Tiere sind zu diesem Weg nicht fähig, für sie ist Methionin eine essentielle Aminosäure.

Für die Übertragung der Methylgruppe des Methionins auf einen Akzeptor ist ein hohes Übertragungspotential nötig, das durch die Anlagerung eines Adenosylrestes an den Schwefel unter Bildung eines Sulfonium-Ions aufgebracht wird. Die energiereichen Phosphat-Bindungen des ATP werden dazu gespalten. Die SAM-Synthetase, die diese Aktivierung des Methionins katalysiert, wurde bislang sowohl in Microorganismen wie in höheren Lebewesen (TABOR, 1984) und z.B. auch in Berberis Zellkulturen (RÜFFER, 1987) nachgewiesen.

Das so entstandene SAM dient allerdings nicht nur der Übertragung von Methylgruppen. Auch die andere C-S⁺-Bindung kann gespalten werden, und zwar bei der Synthese der 1-Amino-1-cyclopropan-carbonsäure (ACC) auf dem Weg zu dem Pflanzenhormon Ethylen, oder, nach Decarboxylierung, bei der Übertragung des Propylaminrestes in der Polyaminbiosynthese zum Spermidin und Spermin (TABOR, 1984).

Mit der enzymatischen Synthese von SAM wird sich diese Arbeit ebenfalls beschäftigen.

Für die Produktion biogener Substanzen, die entweder wegen ihrer Komplexität oder ihrer Stereochemie nur schwer durch chemische Synthese zugänglich sind, und wegen des hohen Reinigungsaufwandes oft nicht aus dem produzierenden Organismus gewonnen werden können, hat sich die enzymatische Synthese, zumindest im Labormaßstab als sehr hilfreich erwiesen. Die Bereitstellung von ausreichend großen Mengen an preiswertem Enzym stellt bislang noch das größte Hemmnis für

die Anwendung solcher Prozesse im großen Maßstab dar, so daß heute vor allem Enzyme verwendet werden, die aus dem Primärstoffwechsel stammen, und von einigen Microorganismen überproduziert werden und so billig zu isolieren sind (z.B. Glucoseisomerase in der Fructose Herstellung)(MAUGH, 1984). Die Möglichkeiten der Gentechnologie, solche Überproduzenten zu schaffen, mögen hier Abhilfe bringen. Einen weiteren Ausweg stellt die Umstellung von der homogenen zur heterogenen Katalyse dar, die es ermöglicht, das an einen unlöslichen Träger gebundene Enzym wiederholt oder kontinuierlich zu verwenden. Diese Wiederverwendung hat allerdings ihre Grenzen, denn ein anderes Problem, das der enzymatischen Synthese anhaftet, ist die Instabilität des Katalysators. Die Ursachen für die Zerstörung der katalytischen Aktivität, bei höheren, wenn auch noch physiologischen Temperaturen können vielfältiger Natur sein, und sind im Einzelfall nicht leicht zu ergründen. Es hat sich aber gezeigt, daß es zu einer bedeutenden Stabilisierung des Enzyms, und so zu einer verbesserten Rentabilität durch die Immobilisierung kommen kann (KLIBANOV, 1979; PFITZNER, 1984). Wahrscheinlich ist die für die Katalyse notwendige räumliche Struktur des Proteins durch die Fixierung an den Träger besser vor einer thermisch bedingten Auseinanderfaltung geschützt. Der beobachtbare Stabilitätsgewinn kann allerdings auch nur scheinbarer Art sein, wenn das Microenvironment der porösen Trägerpartikel berücksichtigt wird (WEETALL und PITCHER, 1986).

Im Rahmen dieser Arbeit soll neben der Synthese von SAM mit immobilisierter SAM-Synthetase auch versucht werden, Enzyme aus der Biosynthese des Berberins, vor allem das Berberinbrücken-Enzym, anzureichern und in immobilisierter Form zur Produktion von Intermediaten zu nutzen. Ein weiteres Ziel wird die Reinigung und Charakterisierung der bislang noch nicht nachgewiesenen 6-O-Methyllaudanosolin 4'-O-Methyltransferase in der Biosynthese des Reticulins sein (Nr. 3 in Abb. 3). Zusammen mit einer Untersuchung der Norlaudanosolin 6-O-Methyltransferase und Norreticulins N-Methyltransfe-

rase soll der Versuch unternommen werden, die Abfolge der Methylierungsschritte zum Reticulin zu ordnen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. H.G.Floss (OSU, Columbus, USA) soll versucht werden, mit Hilfe chiral markierter Methylgruppen einen Einblick in die Reaktionsmechanismen der Methyltransferasen, des Berberinbrücken-Enzyms und der Bildung und Öffnung der Methylendioxybrücke im Berberin zu erhalten.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Pflanzliche Zellkulturen

Die verwendeten Kulturen entstammen der Sammlung des Institutes für pharmazeutische Biologie, München. Die Anzucht der Suspensionskulturen erfolgt in Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965), das 25 min bei 120°C, 2 bar autoklaviert wird. Erhaltungskulturen werden in 1 l-Erlenmeyerkolben mit 250 ml frischem Medium und 150 ml Inokulum wöchentlich überimpft. Die Produktion größerer Gewebemengen erfolgt in Fernbachkolben mit 1 l Medium und 300 ml 7 Tage altem Inokulum. Nach 10-12 tägigem Wachstum bei 24°C im Dauerlicht (650 lux) mit 100/min auf Rotationsschüttlern, wird das Gewebe abfiltriert und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Lagerung bei -20°C.

Kalluskulturen werden auf LS-Medium mit Zusatz von 1% Agar, in Kunststoffpetrischalen (6 cm ϕ) im Dunkeln gezogen und nach 20 Tagen auf frisches Medium übertragen.

1.2 Bakterien

Für die Isolierung der SAM-Synthetase werden zwei Stämme von Escherichia coli K-12 verwendet, die mir dankenswerter Weise von Prof. H.G.Floss (OSU, Columbus, USA) zur Verfügung gestellt wurden.

Der Stamm E.coli EWH 47 stellt eine Mutante des metJ Gens dar, dessen Genprodukt gemeinsam mit SAM die Expression der SAM-Synthetase steuert (SU und GREENE, 1971; SAINT-GIRONS et al., 1986). Dadurch weist dieser Stamm einen höheren Gehalt an SAM-Synthetase gegenüber dem Wildtyp auf.

Der Stamm E.coli DM 25 pKA8 (MARKHAM 1984; MARKHAM et al., 1984) enthält zusätzlich das Strukturgen metK für das Enzym auf dem Plasmid pKA8, wodurch die Überproduktion der SAM-Synthetase weiter gesteigert wird.

Die Anzucht der Bakterien erfolgt in LB-Medium (Trypton 10 g, Hefeextrakt 5 g, NaCl 10 g in 1 l Wasser; pH 7,5 / NaOH). Festmedium enthält 1% Agar. E.coli DM 25 pKA8 besitzt eine Resistenz gegen Tetracyclin, so daß zum Erhalt des Plasmids dem Medium 20 µg/ml Tetracyclin zugesetzt werden. Die Flüssigkulturen werden nach 12 Stunden Wachstum mit 15 % Glycerin versetzt und so bei -20°C gelagert.

Zur Produktion größerer Bakterienmengen wird ein 20 l Fermenter (23 cm Ø x 50 cm) benutzt, in dem das Medium durch Luftdurchsatz in Bewegung gehalten wird. Die 18,5 l LB-Medium, denen 2 ml Silicon-Antischaummittel zugesetzt werden, werden 30 min bei 120°C, 2 bar autoklaviert. Als Inokulum werden 3x 400 ml Vorkultur in 1 l Erlenmeyerkolben benutzt, die ihrerseits mit je 20 ml angeimpft werden. Die Vorkulturen wachsen jeweils etwa 12 h bei 37°C auf einem Rotationsschüttler (200/min). Der Fermenter wird durch ein Wasserbad ebenfalls auf 37°C gehalten. Er wird 18 h nach dem Animpfen abgeerntet. Dies geschieht entweder mit einer Durchlaufzentrifuge, oder effektiver aber arbeitsaufwendiger mit einem Sorvall GS-3 Rotor (9.000/min, 10 min). Typischerweise können auf diese Weise etwa 60 g Bakterien (Feuchtmasse) erhalten werden, die mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert werden.

1.3 Chemikalien

Merck: Ammoniumpersulfat, Ninhydrin.

Serva: Acrylamid, Controlled pore glass (CPG-10), N-Ethylmaleinimid, Hepes, Jodacetamid, Jodosobenzoessäure, Methionin, N,N'-Methylenbisacrylamid, Rinderserumalbumin.

Sigma: Aktivkohle, Amberlite CG-50, Aminopropyltriethoxysilan, ATP, Catechol-O-Methyltransferase, N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-HCl (EDC), Dextran, SAH, SAM, Streptomycin-Sulfat, Tetracyclin,

Radioaktiv markiertes (Methyl-³H)-Methionin und (Methyl-¹⁴C)-Methionin stammen von Amersham Buchler.

Die meisten der als Vergleichssubstanzen verwendeten Alkaloide stammen aus der Sammlung von Dr. M.Rüffer (Inst. f. pharm. Biologie, München) und von Prof. N.Nagakura (Kobe, Japan), dem ich vor allem für das für diese Arbeit so wichtige 6-O-Methylaudanosolin und seine getrennten Stereoisomeren zu Dank verpflichtet bin. Norcoclaurin, Coclaurin, N-Methylcoclaurin, Norarmepavin und Armepavin wurden von Prof. B.Cassels und R.Stadler, Isococlaurin von S.Löffler (alle Inst. f. pharm. Biologie, München) synthetisiert, und mir dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

Für die Reinigung der Enzyme werden folgende Säulenmaterialien verwendet. XAD-2 (Serva), DEAE-Sephacel, Phenyl-Sepharose, AH-Sepharose, aktivierte CH-Sepharose, Phenyl-Superose, Mono Q, Polybufferexchanger PBE 94 und Polybuffer 74 (alle Pharmacia), TSK-HW 55S (Merck), DE-52 (Whatman), TSK G 3000 SW UltroPac (LKB).

Für die HPLC-Trennungen niedermolekularer Substanzen wird Nucleosil-SA 10 µm und Nucleosil C-18 10 µm (Macherey und Nagel) verwendet. Die Säulen stammen von der Fa. Bischoff. Für die Säulenchromatographie von Alkaloiden wird Sephadex LH-20 verwendet.

Für die Dünnschichtchromatographie werden Kieselgelfolien Polygram Sil G/UV₂₅₄ mit 0,25 mm Schichtdicke (Macherey und Nagel) verwendet.

1.4 Geräte

Zentrifugen: Sorvall RC 58, temperierbar mit den Rotoren GS-3, GSA, SS 34 (Du Pont). Für den RIA wird eine Cryofuge 6-6 (Heraeus) verwendet. Durchlaufzentrifuge Labofuge 15.000 (Heraeus).

UV-Spektren und Extinktionsmessungen werden mit Uvikon 810 (Kontron) und DMR 11 (Zeiss) durchgeführt.

pH-Werte werden mit Digi 610 (WTW) und CG 812 (Schott) gemessen.

HPLC-Trennungen werden mit Anlagen der Firmen

Abimed-Gilson -- 2 Pumpen 303, Mixer, Photometer 111, Fraktionssammler 201, Gradientenprogramm 702 auf Apple, Spectra-Physics -- Pumpe SP 8070, Autosampler SP 8780 XR, Photometer SP 8440, Integrator SP 4200 und

Waters-Millipore -- 2 Pumpen 510, Autosampler WISP 710 B, Photometer Lambda-Max 481, Automated Gradient Programmer, Integrator Data Module 740 durchgeführt.

Für die Reinigung von Proteinen steht ein Chromatographie System von LKB zur Verfügung: Pumpe Varioperpex II, Gradientenmischer Ultrograd 11300, Photometer Uvicord 3 und Fraktionssammler Ultrorac.

Außerdem wird eine FPLC-Anlage der Firma Pharmacia verwendet: 2 Pumpen P-500, Pumpe P-1, Mixer, Motorventil MV-7, Superloop 50 ml, Photometer UV-1, Fraktionssammler FRAC-100, Steuergerät LLC 500.

Die beiden letzten Systeme stehen in Kühlschränken bei ca. 6-10°C - CombiCold Rac LKB.

Für die enzymatischen Untersuchungen wird ein Eppendorf System eingesetzt (Zentrifuge, Schüttler, Mixer, Pipetten), ein Wasserbad mit einem Thermostaten Thermomix 1420 (Braun) und ein Rotationsmischer (Heidolph) zur Extraktion von Enzymansätzen.

Die Elektrophorese-Netzgeräte Power Supply stammen von LKB, ebenso die Horizontalapparatur für Dünnschichtgele Multiphor 2117, die mit einem Thermostaten Haake F3 gekühlt wird. Flachgele werden mit Slab Gel Drier 2003 von LKB getrocknet. Zur Gefriertrocknung steht ein Edwards Modulyo zur Verfügung.

Massenspektren werden mit einem Finnigan Mat 44S aufgenommen.

Für die ^{13}C -NMR-Spektroskopie steht ein Gerät der Fa. Bruker mit 360 MHz zur Verfügung. Für die Durchführung der Messungen danke ich Herrn R.Stadler.

2. Methoden

2.1 Herstellung zellfreier Enzympräparationen

2.1.1 Pflanzliche Zellen

Tiefgefrorenes Zellmaterial wird in der doppelten Menge Aufschlußpuffer (100 mM Kaliumphosphat pH 8 mit 20 mM Mercaptoethanol) aufgetaut, durch 4 Lagen Mull abgepreßt und bei 4°C abzentrifugiert (GSA, 10.000/min). Der klare Überstand, der Rohextrakt, wird zur Abtrennung der Alkaloide über eine XAD-2-Säule (2,5 cm ϕ x 20 cm), die vorher mit Methanol und dann mit Aufschlußpuffer gründlich gewaschen wurde, gegeben. In der Regel wird diese XAD-Säule direkt vor die erste Trennsäule eines Reinigungsganges eingebaut.

2.1.2 Bakterien

Der Aufschluß bakterieller Zellen erfordert erheblich stärkere Kräfte als sie für pflanzliche Zellen notwendig sind, die durch einfaches Einfrieren und Auftauen auseinanderbrechen. Die tiefgefrorenen Zellen werden in eine ebenfalls tiefgekühlte Bio-X Presse eingefüllt und unter hohem Druck durch eine kleine Öffnung gepreßt. Durch die hohen Scherkräfte werden die Zellen zerstört. Anschließend werden die Zellbruchstücke in der vierfachen Menge Aufschlußpuffer (100 mM Hepes pH 8 mit 0,1% Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 1 mM EDTA, 3 μ M Phenylmethylsulfonylfluorid; modifiziert nach MARKHAM et al., 1980) suspendiert und aufgetaut. Alle weiteren Schritte werden in Eis durchgeführt. Die viskose Lösung wird mit einer 5%-igen Streptomycinsulfat Lösung (2,5 ml/10 ml) versetzt, um DNA auszufällen. Nach 15 min wird abzentrifugiert (SS 34, 10.000/min). Der Überstand wird als Rohextrakt weiterverarbeitet.

Für kleine Aufschlüsse eignet sich auch die Behandlung der in Aufschlußpuffer suspendierten Zellen mit Ultraschall (5 x 20 sec mit Sonifier, Branson).

2.2 Enzymtests

2.2.1 SAM-Synthetase

Der Test wird modifiziert nach MARKHAM et al., (1980) und CHOU und LOMBARDINI, (1972) durchgeführt.

In 100 µl Volumen werden eingesetzt:

Stock Lsg.		Endkonzentr.—	Substratmenge pro Test
5 µl KCl	1 M	50 mM	
5 µl MgCl ₂	1 M	50 mM	
10 µl Tris pH 8,3	1 M	100 mM	
20 µl ATP	100 mM	20 mM	2 µmol
10 µl ³ H-Methionin	1-10 mM	0,1-1 mM	10-100 nmol 70.000 cpm
50 µl Enzym / H ₂ O			
100 µl			

Die eingesetzte Menge an Methionin und Enzym richtet sich nach der zu bestimmenden Aktivität. Standardmäßig werden für die Bestimmung des Enzyms aus E.coli EWH 47 10 nmol (0,1 mM) Methionin in einen Test eingesetzt und bei Enzym aus E.coli DM 25 100 nmol (1 mM). Die Ansätze werden 30 min bei 30°C inkubiert. Zum Abstoppen werden die Ansätze in Eiswasser gestellt und jeweils 50 µl auf ein 1 x 1 cm² großes Cellulosephosphat Papier P-81 (Whatman) pipettiert und mit dem Fön getrocknet. Anschließend wird das Papier genau 2 Minuten unter fließendem Wasser ausgewaschen. Die Papierstücke werden in Szintillationsgläsern zusammen mit Quickszint 2000 (Zinser) ausgezählt. Da der Szintillator nur langsam in das Papier eindringt, werden mindestens 2 Stunden bis zur endgültigen Auszählung gewartet.

Der Test basiert auf der Fähigkeit von SAM, auf Grund seiner Ladung an das Cellulosephosphat Papier zu binden, während sich Methionin leicht auswaschen läßt. Es hat sich aber gezeigt, daß übermäßiges Auswaschen auch zu einem beträchtlichen Verlust an SAM führt. Deshalb ist immer dieselbe,

kurze Zeit einzuhalten.

Die Wiederfinde-Rate und die Zähllausbeute für SAM betragen zusammen etwa 60 % bei diesem Test. Entscheidend für die Testauswertung ist die radiochemische Reinheit des eingesetzten Methionins. Methionin mit hoher spezifischer Radioaktivität unterliegt einer raschen chemischen Umsetzung, die durch Verdünnen mit unmarkiertem Methionin deutlich verlangsamt werden kann. Die Reinheit ist jeweils mit DC zu prüfen (s.S. 24).

Eine andere Möglichkeit den aktuellen 100 % Wert des Tests festzulegen, besteht darin, einen Test nur mit radioaktivem Methionin ausreichend lange zu inkubieren und der ganzen Waschprozedur zu unterwerfen. Der so ermittelte Wert enthält alle Verluste durch Zersetzung, Auswaschen aus dem P-81 Papier und Zähllausbeute, und gibt so den maximal erreichbaren Wert an.

Dieses und die beiden nächsten Testverfahren messen den Endpunkt einer Reaktion und verfolgen sie nicht kontinuierlich. Daher ist es notwendig sicherzustellen, daß dieser Endpunkt noch in dem linearen Anfangsbereich der Zeit-Umsatzkurve liegt, damit die aus ihm errechnete Reaktionsgeschwindigkeit auch mit der realen Anfangsgeschwindigkeit übereinstimmt. Für die SAM-Synthetase zeigt sich, daß in den Testansätzen nicht mehr als 10 % Umsatz erreicht werden darf, um noch eine gültige Aussage zu erhalten.

2.2.2 Methyltransferasen

Alle untersuchten Methyltransferasen werden mit einem prinzipiell gleichen Test bestimmt, in dem lediglich das Substrat und der pH-Wert verändert werden (RÜFFER et al., 1983a).

Für die 6-O-Methyltransferase wird 4'-O-Methylnorlaudanolin als Substrat verwendet. Eine Kreuzreaktivität mit N-Methyltransferase ist nicht zu befürchten, da diese Substanz nicht als Substrat von der NMT angenommen wird (s.S. 109). Als Puffer dient 0,5 M Hepes pH 7,8. Für die NMT wird Norre-

ticulin als Substrat und 0,5 M Hepes pH 7,4 und pH 6,8 verwendet, und für die 4'-O-Methyltransferase 6-O-Methyl-laudanosolin und 0,5M Hepes pH 8,2.

In 150 µl Volumen sind enthalten:

Stock Lsg.		Endkonzentr.-- Substratmenge pro Test		
20 µl	Puffer	500 mM	67 mM	
5 µl	Ascorbat	500 mM	16 mM	
5 µl	Substrat	5 mM	167 µM	25 nmol
10 µl	³ H-SAM	1 mM	33 µM	10 nmol 15.000 cpm
<u>110 µl</u> Enzym / H ₂ O				
150 µl				

Die Ansätze werden, je nach erwarteter Aktivität, 30-60 Minuten bei 37°C inkubiert. Abgestoppt wird durch Zugabe von 200 µl eiskalter 0,2 M NaHCO₃ Lsg. und 400 µl Isoamylalkohol. Die Ansätze werden mindestens 5 Minuten lang am Rotationsmischer extrahiert und abzentrifugiert. Von der organischen Phase werden 300 µl ausgezählt.

Bei diesem Test wird die markierte Methylgruppe des SAM auf ein Alkaloid übertragen, das im alkalischen extrahierbar ist. Nicht umgesetztes SAM bleibt in der wässrigen Phase zurück.

Die Wiederfinde-Raten bei dieser Extraktion sind für Norreticulin 90%, für Reticulin 80% und für Scoulerin 80%, unabhängig von der Menge, in einem Bereich von 0,5 - 100 nmol. Als 100% Umsatz werden also entsprechend 80 oder 90 % des eingesetzten SAM gerechnet. Die Inkubationsdauer und die Enzymmenge werden so bemessen, daß nicht mehr als 5-10% des eingesetzten SAM umgesetzt werden, weil die Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren Umsätzen sehr schnell abnimmt.

2.2.3 Berberinbrücken-Enzym

Das Testverfahren wird nach STEFFENS (1984) durchgeführt (Tritium-Ausbaute).

In 150 μ l Volumen sind enthalten:

Stock Lsg.		Endkonzentr.-- Substratmenge pro Test		
30 μ l	Glycin/NaOH pH 9,0	0,3 M	60 mM	
5 μ l	(S)-Reticulin	0,5 mM	17 μ M	2,5 nmol
20 μ l	(S)-(N-C ³ H ₃)-Reticulin			20.000 cpm
<u>95 μl</u>	Enzym / H ₂ O			
150 μ l				

Die Ansätze werden 30-60 Minuten, je nach Enzymaktivität, bei 37°C inkubiert. Abgestoppt wird die Reaktion durch Zugabe von 250 μ l wässriger Aktivkohlesuspension (4g/100ml). Die Ansätze werden 5 Minuten geschüttelt, abzentrifugiert und 300 μ l des klaren Überstandes werden ausgezählt.

Das in der N-Methylgruppe markierte Reticulin verliert bei dem Ringschluß eines der drei Tritiumatome in das wässrige Medium. Durch den Zusatz von Aktivkohle werden die Alkaloide an das Adsorbens gebunden, und so aus der wässrigen Phase entfernt. Die Radioaktivität des Wassers ist somit ein Maß für die umgesetzte Alkaloidmenge. Als 100 % Umsatz wird 1/3 der eingesetzten Radioaktivität gerechnet.

Die Reaktion ist bis 40 % Umsatz von Reticulin annähernd linear.

Zu berücksichtigen ist, daß in den Ansätzen enthaltene (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase die Meßwerte, je nach deren Aktivität, bis zu verdoppeln kann, da ein weiteres Tritium aus dem entstandenen Scoulerin ausgebaut wird.

Der von STEFFENS (1984) beschriebene Isotopeneffekt des Berberinbrücken-Enzyms führt zu einem insgesamt zu niedrigen Meßergebnis, weil der Ausbau von Tritium deutlich langsamer erfolgt (STEFFENS: $k_H/k_T = 1,64$; s.S. 168) als der von Wasserstoff. Bei vergleichenden Messungen, bei denen keine Absolutwerte bestimmt werden, sollte dieser Effekt aber keine Rolle spielen.

2.2.4 (S)-Tetrahydroprotoberberin-Oxidase (STOX)

Zur Bestimmung wird ein optischer Test verwendet (AMANN, 1986).

In 500 μ l Volumen sind enthalten:

Stock Lsg.	Endkonzentr.-- Substratmenge pro Test		
100 μ l Glycin/NaOH pH 9,0	0,3 M	60 mM	
10 μ l (S)-Norreticulin	5 mM	100 μ M	50 nmol
<u>390 μl Enzym / H₂O</u>			
500 μ l			

Die Reaktion wird im Photometer bei 340 nm registriert ($E_{340} = 3,25$ für eine 1 mM Lösung von Dehydronorreticulin). Die Küvette wird auf 30°C temperiert.

2.3 Proteinbestimmung

Der Gehalt an Protein wird mit der Methode nach BENSADOUN und WEINSTEIN (1976) bestimmt. Die Volumina wurden auf ein Maß reduziert, daß der Test mit dem Eppendorf-System durchgeführt werden kann. Der Meßbereich liegt zwischen 1-20 μ g. Für halbquantitative Messungen wird die zeitsparende Methode nach BRADFORD (1976) verwendet. Als Standard dient Rinderse-
rumalbumin.

2.4 Chromatographie

2.4.1 Dünnschichtchromatographie

Für die Trennung von SAM und Methionin werden folgende Laufmittel benutzt:

Nr.	Laufmittel	
1	Ethanol - Wasser - Essigsäure	64 - 35 - 1
2	n-Butanol - Wasser - Essigsäure	12 - 5 - 3

Die Benzylisochinolin und Protoberberin Alkaloide werden mit folgenden Laufmitteln getrennt:

Nr.	Laufmittel	
3	Chloroform - Aceton - Diethylamin	5 - 4 - 1
4	Dichlormethan - Methanol - Ammoniak (ges.NH ₃ -Atmosphäre)	90 - 9 - 1
5	Ethylacetat - Methylethylketon - Ameisensäure - H ₂ O	5 - 3 - 1 - 1
6	Chloroform - Methanol - Ammoniak (25%)	68 - 18 - 0,6
7	Chloroform - Ethanol - Aceton - Ethylacetat	6 - 2 - 1 - 1
8	Methanol - Wasser - Ammoniak (25%)	8 - 1 - 1
9	Ethanol - Chloroform - Essigsäure	63 - 30 - 3

Für alle Trennungen werden Kieselgelfolien verwendet (Polygram Sil G/UV₂₅₄, Macherey Nagel).

Detektiert wird unter UV₂₅₄. SAM und Methionin werden mit Ninhydrin-Reagenz (Ninhydrin 300 mg, Essigsäure 3 ml in 100 ml Ethanol) besprüht und 1 Minute bei 100°C entwickelt. SAM färbt sich dabei schwach rosa, Methionin kräftig orange. Die phenolischen Isochinolin Alkaloide werden mit diazotierter Sulfanilsäure (5mg / 10 ml 10% Na₂CO₃ Lsg.) besprüht. Dieser Nachweis ist empfindlicher als die Löschung von UV₂₅₄.

Nach einem Tag Liegen an der Luft färben sich auch kleinste Substanzmengen ohne Detektionsreagenz intensiv braun.

2.4.2 HPLC

Zur Reinheitsprüfung von SAM werden zwei unterschiedliche Trennsysteme verwendet.

(A) Kationenaustauscher Nucleosil SA 10 µm; Säule 4x250 mm.
Laufmittel: 0,25 M Ammoniumformiat pH 4,5 (isokratisch).

Flußrate: 1 ml / min.

Detektion: 260 nm.

Retentionszeiten (min): ATP, ADP (2,2); AMP (2,7); Adenosin, SAH (5,6); SAM (8,5); unbekannte Verunreinigungen (3,3

und 7,3).

(B) Reversed Phase - Ionenpaarchromatographie (modifiziert nach GROSS et al., 1983) an Nucleosil C-18 10 μm ; Säule 4x250 mm.

Laufmittel: Komponente A - 4 mM Pentansulfonsre. in 10% MeOH
Komponente B - 4 mM Pentansulfonsre. in 90% MeOH
Mit Essigsäure wird der pH auf 4 eingestellt.

Flußrate: 1 ml / min.

Detektion: 254 nm.

Gradient:	Zeit (min)	0	0,5	2	15	20	22,5	25	30
	Komp. A %	100	100	80	67	0	0	100	100
	Komp. B %	0	0	20	33	100	100	0	0

Retentionszeiten (min): ATP, ADP, AMP (2,5); SAM (9,5); SAH, Adenosin (10,5); unbekannte Verunreinigungen (16,4).
Dieses Gradienten-System liefert eine schärfere Trennung als A, dauert aber länger.

(C) Zur Trennung der Benzylisochinoline wird ebenfalls der Kationenaustauscher Nucleosil SA verwendet (modifiziert nach RÜFFER et al., 1983a).

Laufmittel: Komponente A - 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ in 10% MeOH
Komponente B - 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ in 40% MeOH

Flußrate: 1 ml / min.

Detektion: 280 nm.

Gradient:	Zeit (min)	0	1	5	10	12,5	18
	Komp. A %	100	100	0	0	100	100
	Komp. B %	0	0	100	100	0	0

(D) Die Trennung von Protoberberinen, speziell von Jatrorrhizin und Columbamin wird an einer Reversed-Phase Säule Nucleosil C-18 durchgeführt.

Laufmittel: Komponente A: 5 % Acetonitril in Wasser
Komponente B: 90 % Acetonitril in Wasser

beide Komponenten enthalten 100 μ l H_3PO_4 (85%) / 1

Flußrate: 1,5 ml / min.

Detektion: 280 nm.

Gradient:	Zeit (min)	0	0,5	3	20	22	24	26	35
Komp. A %	100	100	78	72	0	0	100	100	
Komp. B %	0	0	22	28	100	100	0	0	

Retentionszeiten (min): Columbamin (16,0);
Jatrorrhizin(16,6).

(E) Ein etwas modifizierter Gradient, bei sonst gleichen Parametern, wird für die Trennung von Reticulin, Scoulerin und Dehydroscoulerin verwendet.

Gradient:	Zeit (min)	0	3	20	30	34	38	45
Komp. A %	100	88	70	0	0	100	100	
Komp. B %	0	12	30	100	100	0	0	

Retentionszeiten (min): Reticulin (12,7); Scoulerin (14,0);
Dehydroscoulerin (19,9).

2.4.3 Synthese von SAH-Affinitätsmedien

SAH-AH-Sepharose

Bei der Aminohexyl-Sepharose wird SAH über seine Carboxylgruppe als Amid angebunden. Die Synthese erfolgt nach der Vorschrift von SHARMA und BROWN (1978), die genau den Angaben des Herstellers entspricht.

1 g AH-Sepharose (40 μ mol Aminogruppen) in 0,5 M NaCl quellen lassen und mit H_2O pH 4,5 auswaschen. 30 mg SAH werden in 5 ml H_2O unter Zugabe von 0,1 M HCl gelöst und mit dem Gel gemischt. Langsam werden 100 mg Carbodiimid (EDC) zugegeben und der pH auf 4,5 eingestellt. Der Ansatz wird einen Tag bei 6°C geschüttelt, und dann wechselweise mit 50 mM Tris + 0,5 M NaCl pH 8 und 50 mM Acetat + 0,5 M NaCl pH 4 und zuletzt mit H_2O ausgewaschen und in eine Säule gefüllt

(3,5 ml Gelbett).

SAH-CH-Sepharose

Bei diesem Träger erfolgt die Anbindung mit einer der beiden Aminogruppen von SAH ebenfalls als Amid an die durch Veresterung mit N-Hydroxysuccinimid aktivierte Carboxylgruppe. Die Synthese erfolgt nach Angabe des Herstellers.

1 g Aktivierte CH-Sepharose in kalter 1 mM HCl quellen lassen und auswaschen. 22 mg SAH in 5 ml H₂O unter HCl Zugabe lösen, den pH dann mit NaHCO₃ auf 8 einstellen und mit dem Gel mischen. Bei Raumtemperatur wird 2 Stunden inkubiert. Danach werden noch verbliebene aktive Gruppen mit 1 M Ethanolamin blockiert und das Gel wie oben angegeben ausgewaschen.

2.4.4 Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen mit Gelpermationschromatographie.

Bei dieser Methode wird zugrundegelegt, daß alle Proteine etwa kugelförmig sind. Je nach ihrer Größe stehen ihnen verschieden große Verteilungsräume im Gelbett zur Verfügung, womit die Auftrennung erreicht wird. Es wird eine TSK G 3000 SW Säule (7,5 mm Ø x 600 mm) zusammen mit der FPLC-Anlage verwendet. Laufmittel 100 mM Kaliumphosphat Puffer pH 6,5. Flußrate 0,25 ml/min. Probenvolumen 200 µl. Der Lauf wird fraktioniert (200 µl) und auf Aktivität getestet. Als Eichproteine dienen Ferritin (450 kD), Phosphorylase b (98 kD), BSA (68 kD), Hühnereiweiß Albumin (45 kD), Carboanhydrase (29 kD), Cytochrom c (12 kD) (alle Serva). In dem Bereich von 30-100 kD ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichtes und dem Retentionsvolumen des Proteins (s.S. 75, Abb. 22).

2.5 Elektrophorese

2.5.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Je nach ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden sich Proteine in ihrem Isoelektrischen Punkt, also jenem pH-Wert, bei dem sich nach außen hin die positiven und negativen Ladungen gerade ausgleichen, sie also in ungeladener Form vorliegen. In einem pH-Gradienten wandern die Proteine in einem angelegten elektrischen Feld genau bis zu diesem pH-Wert und sammeln sich dort zu einer scharfen Bande.

Für analytische Zwecke, zur Kontrolle der Reinheit und der Bestimmung des Isoelektrischen Punktes, hat sich die Verwendung von ultradünnen Gelen (0,15 mm) auf Kunststoffolien wegen des geringen Material- und Zeitaufwandes durchgesetzt. Die Durchführung richtet sich nach den Anweisungen des Herstellers (Serva). Die Probe muß weitgehend salzfrei sein (10 mM) und soll mind. 1-5 µg Protein enthalten. Als Marker für den pH-Gradienten wird die Protein Testmischung 9 (Serva) verwendet. Die Entwicklung beginnt mit 200 V bei 1,2 mA und läuft bis 1600 V bei konst. Stromfluß von 0,1 mA bei einer Leistungsbegrenzung auf 2 W und dauert etwa 2-3 Stunden. Die Gele werden anschließend mit 20% Trichloressigsäure (TCA) fixiert und mit Serva-Blau W (0,04% in 0,4% TCA) gefärbt. Entfärbt wird mit 0,2% TCA. Zum Neutralisieren wird das Gel 10 s in eine 0,02% TEMED Lsg. getaucht. Die Färbeprozedur dauert ca. 45 Minuten.

Für den Nachweis der Enzymaktivität in IEF-Gelen werden Röhrchengele in den Abmessungen 5 x 75 mm gegossen. Gelzusammensetzung nach WRINGLEY (1971): 4 ml Wasser; 1,5 ml Acrylamid Lsg. (30 % Acrylamid + 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid); 0,15 ml Ampholine pH 4,5-6 (LKB); 0,35 ml 1 % Ammoniumpersulfat (frische Lsg.). Diese Menge reicht für 2 Röhrchen. Als Elektrodenpuffer werden 0,2 % H₂SO₄ für die Anode und 0,1 % Triethanolamin für die Kathode verwendet. Die Probe (500 µl), die nicht mehr als 10 mM Salz enthalten soll, wird mit 50 µl Glycerin und 5 µl 0,01 % Bromphenolblau

als Marker versetzt und an der kathodischen Seite unter eine Schutzlösung aus 5 % Glycerin aufgetragen. Die Trennung erfolgt bei 500 V und 6°C, bis der blaue Marker am unteren Ende des Röhrchens als scharfe gelbe Bande fokussiert ist. Die Ampholine, die das Anfärben der Proteinbanden behindern, werden mit 5 % TCA ausgewaschen. Gefärbt werden die Gele mit 0,2 % Coomassie Blue G-250 in MeOH-Essigsäure-H₂O 5-1-4 für 2 Stunden. Entfärbt wird mit MeOH-Essigsäure-H₂O 5-7,5-87,5. Zum Nachweis der Enzymaktivität wird ein parallel mitgelaufenes Gel mit einem Gelschneider (Bio-Rad) in 2,2 mm breite Segmente zerteilt, die separat mit je 0,5 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 8,0 über Nacht extrahiert werden. Der Verlauf des pH-Gradienten wird in einem weiteren Gel bestimmt, das ebenso segmentiert, aber mit je 0,5 ml H₂O extrahiert wird.

2.5.2 Native Disc-Elektrophorese

Es wird das System 1 nach MAURER (1968) verwendet und die selben Röhrchen wie bei der IEF. Das Sammelgel hat eine Länge von 1,5 cm, das Trenngel von 6 cm.

Je Röhrchen werden 200 µl Probe aufgetragen, die wie für die IEF vorbereitet sind. Die Trennung erfolgt bei 6°C mit 2 mA je Röhrchen, bis die Probe in das Sammelgel eingedrungen ist, und weiter mit konst. Stromstärke 4 mA je Röhrchen bei 130 V Anfangsspannung.

Der Nachweis der Enzymaktivität und die Anfärbung der Gele geschieht, mit Ausnahme des TCA Schrittes, ebenfalls wie bei den IEF-Gelen beschrieben.

2.5.3 SDS-Elektrophorese

Neben der Gelpermeationschromatographie wird das Molekulargewicht von Proteinen mit Hilfe der denaturierenden SDS-Elektrophorese ermittelt, bei der die proteineigene Ladung durch SDS überdeckt wird, und die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel nur noch von der Molekülgröße und -form abhängt.

Die Flachgele (1 mm dick; 14 cm breit; Trenngel 15 cm hoch;

Sammelgel 3,5 cm hoch; 10 % Acrylamid) werden nach den Angaben von BLACKSHEAR, (1984) hergestellt (sog. Laemmli Gel). Jedes Gel enthält 8 Probentaschen (1 x 1,4 cm²; 140 µl) oder 12 Probentaschen (0,5 x 1,4 cm²; 70 µl).

Die Proben werden gefriergetrocknet (Speed Vac, Fa.Savant) und in 50 µl Probenpuffer gelöst. Zur vollständigen Denaturierung und Spaltung von Disulfidbrücken werden die Proben 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Als Molekulargewichtsmarker werden Vergleichsproteine (Bio-Rad) ebenso behandelt.

Die Trennung erfolgt bei 6°C mit konst. 20 mA und etwa 150 V Anfangsspannung.

Die Gele werden 1 Stunde gefärbt und über Nacht entfärbt (Reagentien wie bei den IEF Röhrchengelen angegeben).

Getrocknet werden die feuchten Gele auf Filterpapier Whatman Nr.1 unter Vakuum bei ca. 60°C (Slab Gel Drier, LKB).

2.6 Radioaktivitätsbestimmung

Die Radioaktivitätsmessungen bei den Enzymtests und in anderen wässrigen oder organischen Lösungen erfolgt mit dem Szintillationszähler BF 5004 (Berthold). Als Szintillator werden 5 ml Rotiszint (Roth) verwendet. Die Verteilung der Radioaktivität auf Dünnschichtchromatogrammen wird mit dem Dünnschichtscanner II oder dem Automatic TLC Linear Analyzer (beide Berthold) bestimmt. Mit dem zweiten Gerät ist eine quantitative Auswertung der Chromatogramme möglich.

Zur Ermittlung der Verteilung der Radioaktivität in HPLC-Trennungen, werden diese Läufe in 300 µl Schritten fraktioniert (Abimed-Gilson Anlage). Je 200 µl werden von jeder Fraktion ausgezählt.

2.7 Radioimmunoassay (RIA) zur Bestimmung von (R)- und (S)-Reticulin

Die Durchführung richtet sich nach den Angaben von Frau WIEZCOREK (1985), die die Tests entwickelt hat.

Der methanolische Extrakt, der gemessen werden soll, wird

mindestens 1+3 mit H₂O verdünnt, da MeOH in höheren Konzentrationen stört.

Die Antiseren werden in einer Verdünnung verwendet, bei der etwa 30-50 % des markierten Tracers ((R)- bzw. (S)-N-C³H₃-Reticulin), in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen gebunden werden. Dieser Titer wurde vor Testbeginn in einer Verdünnungsreihe für das Serum für (R)-Reticulin zu 1/8 und für (S)-Reticulin zu 1/5 bestimmt.

In einem Testansatz (950 µl) sind enthalten:

500 µl 70 mM Phosphatpuffer pH 5,7

100 µl Rinderserumalbumin

100 µl Tracer 8000 cpm

50 µl H₂O

100 µl Antiserumverdünnung

50 µl Probe oder Standard

Der Ansatz inkubiert eine Stunde bei Raumtemperatur und wird dann, zur Trennung von gebundenem und nicht gebundenem markiertem Antigen, mit 1,25 ml 80 % gesättigter Ammoniumsulfat Lsg. eine Stunde gefällt. Der abzentrifugierte Niederschlag wird einmal mit 1 ml 49 % Ammoniumsulfat Lsg. gewaschen, erneut abzentrifugiert, in 250 µl H₂O gelöst und mit 1 ml Szintillator (Minisolve 1, Zinser) ausgezählt.

Alle Proben werden als Doppelwerte bestimmt, die Standardkurve (0,05-50 ng) als Trippelwerte. Der Meßbereich, also der lineare Teil der Standardkurve liegt für (R)-Reticulin zwischen 0,09-5 ng und für (S)-Reticulin zwischen 0,4-10 ng.

2.8 Immobilisierung von Enzymen

Für die Immobilisierung verschiedener Enzyme werden einerseits Glaskugeln (Controlled Pore Glass CPG-10, Serva) als anorganischer Träger, andererseits verschieden derivatisierte Sepharose Gele verwendet.

Das Verfahren für die Glaskugeln richtet sich nach der Vorschrift von WEETALL, (1976). Im ersten Schritt wird die Oberfläche der Glaskugeln mit einer Schicht überzogen, die an kurzen Spacern (3 C Atome) Aminogruppen trägt, an die in

einem zweiten Schritt mit Glutardialdehyd das Protein ebenfalls über seine freien Aminogruppen gebunden wird.

1 g Glas wird in 20 ml H_2O suspendiert und mit 200 μ l Aminopropyltriethoxysilan versetzt. Der pH wird auf 3-4 mit HCl eingestellt. Nach 2 Stunden bei 75°C im Wasserbad wird das silanisierte Glas abgesaugt, mit H_2O gründlich ausgewaschen und bei 100°C getrocknet. In dieser Form ist das Glas lagerfähig. Für die Kopplung mit dem Enzym wird 1 g dieses silanisierten Glases zwei Stunden bei Raumtemperatur in 25 ml 2,5% Glutardialdehyd in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 auf einem Schüttler suspendiert. Das Glas färbt sich dabei orange bis braun. Der überschüssige Aldehyd wird gründlich mit H_2O ausgewaschen. Das feuchte Glas wird zu der Enzymlösung (in Hepes- oder Phosphatpuffer pH 7-8,5) gegeben und über Nacht bei 6°C auf einem Schüttler inkubiert. Der Überstand wird abgetrennt und sein Proteingehalt (hieraus errechnet sich der Anteil an gebundenem Protein) und seine Aktivität bestimmt. Das Glas wird mit 0,5 M Tris pH 7-8,5 + 0,5 M NaCl weitere 4 Stunden inkubiert, um freie Aldehydstellen zu blockieren und locker assoziiertes Protein abzulösen. Dann wird mit dem jeweiligen Puffer ausgewaschen und auf ein festes Volumen aufgefüllt.

Von den Sepharose Derivaten wird die Aminoethyl Sepharose (AH) ebenso wie das silanisierte Glas mit Glutardialdehyd behandelt. Die anderen Derivate (aktivierte CH-, CNBr-, Tresyl-Sepharose, alle Pharmacia) werden in eiskalter 1 mM HCl gequollen, kurz mit H_2O gewaschen und sofort zu der Enzymlösung gegeben, die 0,5 M KCl enthält, um unspezifischen Wechselwirkungen mit der Matrix vorzubeugen. Die Gele werden ebenfalls über Nacht bei 6°C inkubiert und wie das Glas weiter verarbeitet.

Die Aktivität der verschiedenen trägergebundenen Enzyme wird in den Standardtests bestimmt. Wegen der raschen Sedimentation, vor allem der Glaskugeln, werden die Testansätze während der Inkubation mit einem Rotationsmischer bewegt. Die Aktivität kann dadurch nur bei Raumtemperatur bestimmt werden.

thyljodid liefert natürlich beide Stereoisomere (De la HABA et al., 1959). Die enzymatische Synthese sollte dagegen ein Produkt liefern, das stereochemisch rein und frei von Verunreinigungen ist. Das Enzym wurde bislang in einer Vielzahl von Organismen nachgewiesen. Besonders gut untersucht, bis auf die genetische Ebene, ist das Enzym aus E.coli (MARKHAM et al., 1980, 1984). Die verfügbaren Überproduzenten (s.S. 15) machen E.coli zu der geeignetsten Quelle für die Gewinnung des Enzyms. Allerdings ist bekannt, daß das Enzym aus Hefe eine deutlich geringere Produkthemmung durch SAM erleidet (K_i E.coli 0,01 mM; K_i Hefe 60 mM (GREENE, 1969)) und damit natürlich für Synthesen geeigneter erscheint. Durch die hohen Ausbeuten an Enzym aus E.coli mag dieser Nachteil wettgemacht werden.

1.1 Reinigung der SAM-Synthetase

Das Enzym wird aus den beiden E.coli Stämmen EWH 47 und DM 25 pKA8 nach dem selben Verfahren isoliert wie es von MARKHAM et al. (1980) beschrieben wurde. Da das Enzym für Synthesezwecke benötigt wird, ist nicht eine hohe Anreicherung, sondern ein möglichst hoher Ertrag an Enzymaktivität das Ziel der Reinigung. Es sollen aber störende, SAM zersetzende Aktivitäten (z.B. SAM-Decarboxylase) abgetrennt und die Fremdproteinmenge möglichst reduziert werden, um den Verbrauch an Trägermaterial bei der anschließenden Immobilisierung zu begrenzen.

Als Standardpuffer für die Chromatographie-Schritte wird 10 mM Hepes pH 8 mit 10 % Glycerin, 0,1 % Mercaptoethanol und 1 mM EDTA verwendet.

Der Rohextrakt (s.S. 19) von 20 g Bakterien (Frischgewicht) wird zunächst mit 22 g / 100 ml Ammoniumsulfat gefällt, der Niederschlag verworfen und der Überstand nochmals mit 12 g / 100 ml versetzt und abzentrifugiert (beidemal SS 34, 10 min, 15.000/min). Der Niederschlag wird in Standardpuffer mit zusätzlich 100 g/l Ammoniumsulfat (0,75 M) gelöst und auf eine mit diesem Puffer äquilibrierte Phenyl-Sepharose Säule

	Volumen (ml)	Gesamt- Protein (mg)	Spezif. Aktivität (pkat/mg)	Gesamt- Aktivität (nkat)	Ausbeute (%)	Reinigung (-fach)
Rohextrakt	165	2900	0,5	1,5	30	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ - Fällung	60	1700	2,9	4,9	100	5,8
Phenyl- Sepharose	130	180	19	3,5	71	38
DEAE- Sephacel	220	27	48	1,3	27	95

Tabelle 1 Übersicht über die Reinigung von SAM-Synthetase aus *E.coli* EWH 47 (aus 30 g Bakterienmasse). Die Aktivität der SAM-Synthetase wird im Standardtest ermittelt.

	Volumen (ml)	Gesamt- Protein (mg)	Spezif. Aktivität (nkat/mg)	Gesamt- Aktivität (µkat)	Ausbeute (%)	Reinigung (-fach)
Rohextrakt	110	3200	0,4	1,3	30	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ - Fällung	50	2000	1,1	2,2	51	3
Phenyl- Sepharose	180	910	2,3	2,1	49	6
DEAE- Sephacel	240	690	6,2	4,3	100	15,5

Tabelle 2 Übersicht über die Reinigung von SAM-Synthetase aus *E.coli* DM 25 pkA8 (aus 20 g Bakterienmasse). Die Aktivität der SAM-Synthetase wird im Standardtest ermittelt.

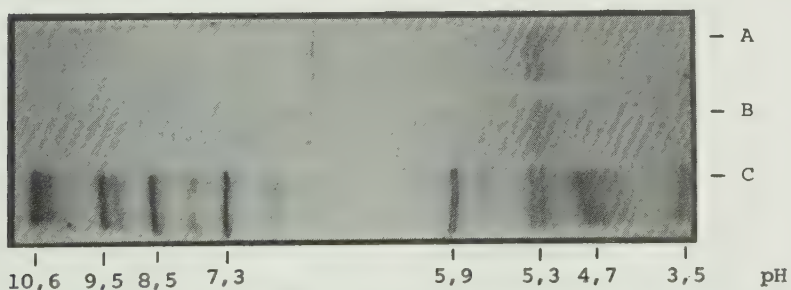
(5 cm ϕ x 10 cm; 200 ml Gelbett) gepumpt. Die Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten von 0,75 M auf 0 M Ammoniumsulfat in 500 ml bei einer Flußrate von 2 ml/min. Die SAM-Synthetase eluiert gegen Ende des Gradienten, bei etwa 0,2 M (NH₄)₂SO₄.

Die aktiven Fraktionen werden zusammen gegen Standardpuffer dialysiert (3 x 2 l, je 3 Stunden) und auf eine mit diesem Puffer äquilibrierte DEAE-Säule (5 cm ϕ x 18 cm; 350 ml Gelbett) gepumpt. Die Elution erfolgt hier mit einem linearen

ren Gradienten von 0-400 mM KCl in Standardpuffer in einem Volumen von 1400 ml mit 3 ml/min. Die Aktivität findet sich bei etwa 200 mM KCl.

Eine Übersicht des Reinigungsverlaufes ist in den Tabellen 1 und 2 dargestellt. Für E.coli EWH 47 wird dabei von 30 g Bakterienmasse ausgegangen. Die Ammoniumsulfat-Fällung und bei E.coli DM 25 auch die weiteren Reinigungsschritte bewirken offenbar die Abtrennung eines unbekannten Hemmstoffes der SAM-Synthetase, wodurch es zu einem Anstieg der meßbaren Enzymaktivität im Verlauf des Reinigungsganges kommt. Der Stamm DM 25 zeigt eine etwa 1000-fach höhere Enzymaktivität gegenüber EWH 47. Dieser von Haus aus sehr hohe Gehalt schlägt sich dann auch in einer geringeren Anreicherung nieder.

Der Versuch, nach einer Druckfiltration durch eine Amicon YM-30 Membran mit Gelfiltration an einer TSK-Säule eine weitere Steigerung zu erreichen, führt lediglich zu einem Verlust an Gesamtaktivität, ohne daß die spezifische Aktivität weiter gesteigert werden könnte. Die Reinheit des Enzyms aus DM 25 vor und nach dem DEAE Reinigungsschritt ist mit einer analytischen IEF dokumentiert, die zeigt, daß auch dieser Schritt nicht mehr viel Fremdprotein abtrennen kann.



Darstellung der Reinheit der SAM-Synthetase aus E.coli DM 25 pkAB nach den Reinigungsschritten an DEAE-Sephacel (A) und Phenyl-Sepharose (B) durch analytische isoelektrische Fokussierung. Bahn (C) enthält pH-Markerproteine (Testmischung 9, Serva).

Abb. 6

1.2 Immobilisierung der SAM-Synthetase

Von GROSS et al. wurde 1983 ein Verfahren zur Immobilisierung von SAM-Synthetase aus Hefe beschrieben, bei dem das Enzym in eine Polymermatrix (PAN) aus Acrylamid und N-Acryloxysuccinimid eingebunden wurde. Die Bindung erfolgte dabei über die mit N-Hydroxysuccinimid veresterte und dadurch aktivierte Carboxylfunktion dieses Polymers, die genau der der aktivierten CH-Sephарose (Pharmacia) entspricht. Dabei wird das Enzym über die freien Aminogruppen des Lysins als Amid gebunden. Mit verschiedenen Trägern soll die Fixierung des E.coli Enzyms versucht werden.

1.2.1 Verschiedene Trägermaterialien

Die Träger, die in Hinblick auf ihre Fähigkeit getestet werden sollen, möglichst viel des angebotenen Enzyms in aktiver Form zu binden, reagieren alle mit primären Aminogruppen. Dabei entstehen bei aktivierter CH-Sephарose Amide, bei CNBr-Sephарose Isoharnstoffe, bei Tresyl-Sephарose, die mit SH-Gruppen außerdem Thioether bildet, Amine und bei dem mit Glutardialdehyd derivatisierten Glas Schiff'sche Basen. Die Prozedur zur Durchführung der Immobilisierung an die einzelnen Materialien ist vorher erläutert worden (s.S. 32). Für

Träger	Protein gebunden	Aktivität
aktiv. CH-Sephарose	89 %	32 %
CNBr-Sephарose	63 %	10 %
Tresyl-Sephарose	37 %	0
Glas CPG-10	95 %	33 %

Tabelle 3

Immobilisierung der SAM-Synthetase (150 pkat, 6 mg) an verschiedene Trägermaterialien (Sephарose Träger je 0,5 g, CPG-10 0,3 g). Der Anteil der gebundenen Aktivität bezieht sich auf das freie Enzym und berücksichtigt nur den gebundenen Proteinanteil.

diesen Versuch wird Enzym aus E.coli EWH 47 verwendet, mit 25 pkat/mg; 150 pkat; 6 mg. Von den Sepharose Trägern werden je 0,5 g und von CPG-10 0,3 g eingesetzt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 3 zu ersehen. Die Anteile an gebundener Aktivität beziehen sich auf die bei Raumtemperatur ermittelte Aktivität des gelösten Enzyms und berücksichtigen dabei nur den tatsächlich immobilisierten Proteinanteil.

1.2.2 Versuche zur Optimierung der Immobilisierung an Glas CPG-10

Mit Glas CPG-10 wird die Kapazität des Trägermaterials und der Einfluß der Proteinkonzentration auf die Effektivität der Immobilisierung ermittelt. Zu Letzterem wird Enzym von E.coli DM 25 verwendet, mit 1,7 nkat/mg. Es werden 5, 10, 18, 25, 35 und 50 mg/ml Enzymlösung an Glas immobilisiert, wobei das Verhältnis Glas / Protein konstant bei 1 g / 50 mg bleibt. In allen Fällen werden zwischen 95 und 98% des Proteins an den Träger gebunden, der einheitlich zwischen 22 und 29% der Ausgangsaktivität enthält. Danach hat die Enzymkonzentration in diesem Bereich keinen Einfluß auf die Ausbeute an immobilisierter Aktivität.

Zur Bestimmung der Proteinkapazität von CPG-10 werden steigende Mengen Enzym mit 1,5 nkat/mg mit 1 g Glas inkubiert. Dabei werden folgende Mengen an Protein und Enzymaktivität gebunden:

Protein eingesetzt (mg)	10	20	50	75	100
Protein gebunden (%)	99	99	99	95	90
Aktivität gebunden (%)	37	31	17	13	4

Obwohl also die Kapazität des Glasträgers in Bezug auf die zu bindende Menge an Protein in diesem Bereich kaum erschöpft wird, nimmt die wiedergefundene Aktivität drastisch ab. Möglicherweise wirken sich bei einer hohen Beladung des porösen Trägers - auch in seinem "Inneren" - Behinderungen

im Massentransfer nachteilig aus, wodurch es zu einer scheinbar geringeren, meßbaren Aktivität kommt, wenn die im Inneren sitzenden Enzyme nicht miterfaßt werden (LILLY und DUNNHILL, 1976).

Eine andere Methode den Anteil der immobilisierten Aktivität zu erhöhen, besteht im Schutz des aktiven Zentrums während der Kopplungsreaktion durch Zusatz der Substrate des Enzyms. Der Zusatz von Methionin und / oder ATP und Mg^{2+} hat aber keine Steigerung der Aktivitätsausbeute erbracht. Dabei muß auch beachtet werden, daß beide Substrate primäre Aminogruppen besitzen und damit in Konkurrenz um die Bindungsstellen am Träger treten.

Nach diesen Ergebnissen hat nur das Verhältnis von Glas zur eingesetzten Menge an Protein einen zu berücksichtigenden Einfluß auf die Ausbeute. Da aber der Träger ein Kostenfaktor der ganzen Prozedur ist, wird als Kompromiß im Weiteren 1 g Glas mit 25 mg Protein inkubiert. In mehreren Ansätzen mit Enzym aus E.coli DM 25 mit 0,5 bis 1,5 μ kat Ausgangsaktivität sind so Ausbeuten zwischen 22 und 30% der eingesetzten Aktivität erreicht worden.

1.3 Eigenschaften der an CPG-10 immobilisierten SAM-Synthetase

1.3.1 Identifizierung des enzymatisch gebildeten Produktes

Die Bindung des Enzymproduktes an das Ionenaustauschpapier, während der Prozedur des Standardtests, deutet zwar die Entstehung von SAM an, ein eindeutiger Nachweis ist aber unerläßlich.

a) Dünnschichtchromatographie

Ein der Menge und dem Volumen nach verdoppelter Testansatz (s.S. 20) mit 150.000 cpm und 100 nmol 3H -Methionin wird mit 95 μ kat an CPG-10 immobilisiertem Enzym, das mit wenig H_2O gewaschen wurde, um den glycerinhaltigen Puffer zu entfernen, 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Je 40 μ l von diesem Ansatz werden in Laufmittel 1 und 2 aufgetrennt. 5-8% der

Radioaktivität finden sich danach noch auf Höhe der Methionin Referenz und 78-83% bei SAM.

b) HPLC

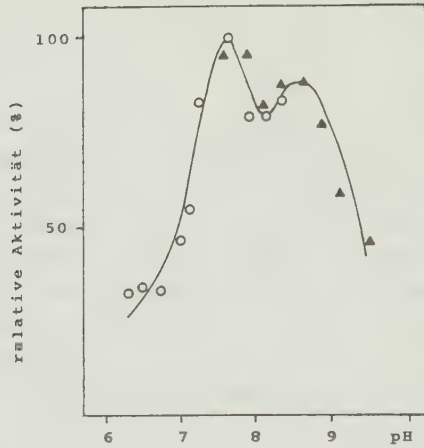
Einem weiteren 30 µl Aliquot des Ansatzes (ca. 20.000 cpm, 12 nmol) werden 10 nmol (das entspricht etwa der enzymatisch gebildeten Menge) authentisches, nicht markiertes SAM zugesetzt und mit dem HPLC-System B aufgetrennt. Die Radioaktivität wird in den Fraktionen gemessen. Auf Höhe der für SAM üblichen Retentionszeit (9,4 min) finden sich etwa 75% der gesamten ermittelten Radioaktivität. Die zugesetzte Referenz und das enzymatisch gebildete Produkt ergeben im UV-Chromatogramm genau einen Peak auf der selben Höhe.

c) Enzymatischer Nachweis

Weitere 50 µl des Ansatzes (ca. 32.000 cpm, 20 nmol SAM) werden zusammen mit 100 nmol (S)-Norreticulín und 5 µkat N-Methyltransferase aus Berberis koetianeana (s.S. 97) zwei Stunden bei 37°C inkubiert (Testbedingungen s.S. 21). Das Reaktionsprodukt wird mit 200 µl Ethylacetat extrahiert und mit DC im Laufmittel 3 aufgetrennt. Schon allein die Tatsache, daß sich Radioaktivität aus der wässrigen Phase extrahieren läßt, spricht für eine Übertragung der Methylgruppe, die nur von SAM stammen kann. Die Radioaktivität findet sich nahezu ausschließlich auf Höhe von Reticulin (R_f 0,55). Diese verschiedenen Nachweismethoden zeigen eindeutig, daß das entstandene Enzymprodukt tatsächlich SAM ist.

1.3.2 pH-Optimum

Die Kenntnis dieses Parameters ist für die Synthese von Bedeutung, da von dem löslichen Enzym in der Literatur ein pH-Optimum von pH 8,2-8,4 angegeben wird (MARKHAM et al., 1980), SAM hingegen im alkalischen Milieu recht instabil ist. Seine Halbwertszeit beträgt bei 30°C und pH 8,8 10 Stunden und bei pH 7,8 36 Stunden (PARKS und SCHLENK, 1958; BORCHARDT, 1979).



Bestimmung der pH-Abhängigkeit der an CPG-10 Glas immobilisierten SAM-Synthetase. Verwendete Puffer (125 mM): ○—○ Hepes/NaOH ▲—▲ Tris/HCl. Die Aktivität wird im Standardtest mit 7 pkat immobilisierter SAM-Synthetase gemessen.

Abb. 7

Die Standardtestansätze enthalten je 30 μ l 0,5 M Puffer in 0,2 pH-Abstufungen (wodurch sich das Volumen der Ansätze auf 120 μ l erhöht) und 7 pkat mit H_2O gewaschenes, an CPG-10 immobilisiertes Enzym und 100 nmol Methionin. Die pH-Werte werden direkt in den Ansätzen nachgemessen.

Es ergibt sich ein sehr breites, zweigipfeliges Maximum im Bereich von pH 7,5-8,5. Das bedeutet, daß die Synthesen in fast neutralem Bereich durchgeführt werden können. Für das an CH-Sepharose gebundene Enzym ergibt sich ein nahezu identisches pH-Profil.

1.3.3 Produkthemmung durch SAM

Wie schon erwähnt, erleidet das Enzym mit einem K_i von 0,01 mM eine ausgeprägte Hemmung durch sein Katalyseprodukt.

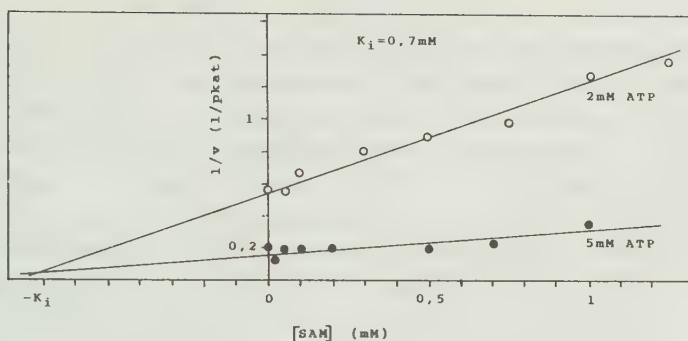


Abb. 8

Darstellung der Hemmung der an Glas immobilisierten SAM-Synthetase durch SAM nach DIXON (1953). Reaktionsbedingungen: 1 mM Methionin, 2 und 5 mM ATP, SAM variiert von 0-1 mM, 7 pkat SAM-Synthetase, 30°C. K_i : 0,7 mM.

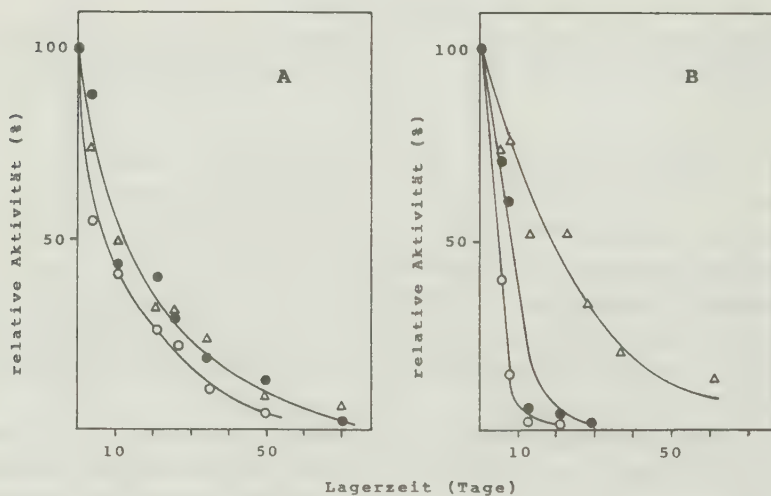
Dabei handelt es sich um eine kompetitive Verdrängung von ATP durch SAM. Dieser Parameter ist für eine geplante Synthese von großer Bedeutung, da es um eine möglichst gute Nutzung der eingesetzten Substrate geht.

In Gegenwart von einmal 2 und einmal 5 mM ATP wird in steigender Reihe 0-1 mM SAM in dem Test eingesetzt, der 100 nmol Methionin und 7 pkat an CPG-10 immobilisiertes Enzym enthält.

Werden die erhaltenen Werte nach DIXON (1953) aufgetragen, schneiden sich die Geraden bei einer kompetitiven Hemmung von ATP in einem Punkt, der den K_i angibt. Unter den gewählten Testbedingungen (2 bzw. 5 mM ATP; 1 mM Methionin; 30°C) ergibt sich danach für das an CPG-10 immobilisierte Enzym doch ein sehr viel höherer K_i -Wert von 0,7 mM, der aber trotzdem für gute Umsatzraten bei den geplanten Synthesen lange Reaktionszeiten erwarten läßt, bedingt durch das rasche Absinken der Reaktionsgeschwindigkeit.

1.3.4 Stabilität der SAM-Synthetase

Das Ziel der Immobilisierung eines Enzyms soll es sein, einen immer wiederverwendbaren Katalysator zur Hand zu haben. Das setzt voraus, daß die Aktivität sowohl während seines Einsatzes, als auch während längerer Lagerzeiten nicht merklich abnimmt. Im Vergleich zueinander werden an CPG-10 immobilisiertes Enzym und lösliches Enzym bei Raumtemperatur (20–22°C), +6°C, -20°C und bei -70°C gelagert. Allen Proben werden 0,05% NaN_3 zugesetzt, um mikrobielles Wachstum in den Proben bei Raumtemperatur zu vermeiden. Der Verlauf der Aktivität ist in Abb. 9 dargestellt. Die SAM-Synthetase ist offenbar ein recht labiles Enzym, das auch bei tiefen Temperaturen nicht zu stabilisieren ist (entgegen



Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Aktivität der (A) an Glas immobilisierten SAM-Synthetase im Vergleich zum (B) freien, löslichen Enzym, bei verschiedenen Temperaturen. ○—○ 20°C, ●—● +6°C, △—△ -20°C. Die Aktivität wird im Standardtest bestimmt. 100 % entsprechen 5 pkat SAM-Synthetase.

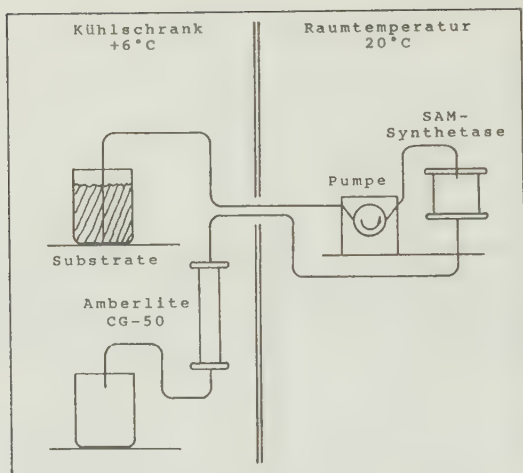
Abb. 9

den Angaben bei MARKHAM et al., (1980), die es bei -70°C als unbegrenzt haltbar beschreiben). Die Immobilisierung bringt lediglich leichte Verbesserungen. Die Halbwertszeit bei Raumtemperatur, also der Arbeitstemperatur, ist etwa doppelt so lang, wie die des löslichen Enzyms. Im einzelnen betragen die Halbwertszeiten:

Halbwertszeiten	20°C	$+6^{\circ}\text{C}$	-20°C
CPG-10 immob. SAM-Synthetase	10 d	20 d	20 d
Lösliche SAM-Synthetase	5 d	10 d	20 d

1.4 Enzymatische Synthese von SAM

Mit den oben hergestellten Trägern von SAM-Synthetase sollen substantielle Mengen an SAM synthetisiert werden. Dazu bieten sich zwei grundlegend unterschiedliche Verfahren an. Zum einen kann das immobilisierte Enzym in eine Säule gepackt werden und so als Durchflußreaktor betrieben werden, oder es wird zusammen mit seinen Substraten in einem Batch-Verfahren suspendiert. Diese zweite Methode erscheint aber für die vorgesehene Synthese nicht sehr zweckmäßig, wenn sie auch in der Durchführung den geringsten apparativen Aufwand erfordert. Bei einem reinen Batch-Verfahren befinden sich alle Reaktionspartner und ihre Produkte während der gesamten Dauer des Verfahrens im Ansatz, und sind so einem rascheren Zerfall durch die erhöhte Reaktionstemperatur (Raumtemp. ca. 20°C) ausgesetzt. Daneben hat sich erwiesen, daß sich trotz der Reinigung der SAM-Synthetase Spuren einer nicht näher bestimmten Aktivität am Träger befinden, die das entstandene SAM langsam wieder abbauen. Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll, sich für das andere Verfahren zu entscheiden, bei dem kontinuierlich eine Lösung durch das trägergebundene Enzym gepumpt und entstandenes Produkt abtransportiert wird. Auf diese Weise können labile Substrate und Produkte bei tiefer Temperatur aufbewahrt werden. Auf Grund seiner Ladung kann das entstandene SAM mit einer an-



Schematischer Aufbau zur Synthese von SAM mit immobilisierter SAM-Synthetase.

Abb. 10

schließenden Kationenaustauscher-Säule (Amberlite CG-50) gleich aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt werden. Die Synthese wird mit CH-Sepharose gebundenem Enzym und mit an CPG-10 immobilisiertem Enzym in gleicher Weise und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Startlösung enthält:

20 mM Hepes pH 7,6	0,1 % Mercaptoethanol
50 mM MgCl ₂	3 mM ATP
30 mM KCl	10 mM Methionin

350 nkat an CPG-10 immobilisiertes Enzym werden in eine Säule (7 cm Ø) gefüllt (ca 0,8 cm Schichtdicke). Typischerweise wird eine Synthese mit 500 ml der Startlösung in etwa 21 Stunden durchgeführt (1,5 mmol ATP, 5 mmol Methionin). Da mit einer, gegenüber der im Standardtest gemessenen Aktivität, stark verminderten Syntheseleistung des Enzyms gerechnet wird, wird die Flußrate der Substratelösung auf

0,4 ml/min oder 1,2 $\mu\text{mol/min}$ (ATP) eingestellt, um eine möglichst weitgehende Umsetzung des eingesetzten ATP zu erreichen. Die Kontrolle der Reaktionslösung nach der Enzymsäule mit HPLC-System A zeigt, daß ATP völlig umgesetzt wird und etwa 85-90% SAM entstehen, neben nicht weiter identifizierten Neben- oder Zersetzungsprodukten. Damit werden nur 5% der ursprünglichen Enzymaktivität tatsächlich genutzt. Eine Steigerung der Flußrate führt aber zu einer nicht vollständigen Umsetzung von ATP. Es ist letztlich eine Kostenfrage, ob eine hohe Effektivität, also Ausnutzung des Substrates, oder eine hohe Produktivität, also Ausnutzung des Enzyms, angestrebt wird. Wahrscheinlich könnten in derselben Zeit höhere Erträge an SAM erhalten werden, wenn höhere ATP-Konzentrationen oder Flußraten, bei Tolerierung einer niedrigeren Umsatzrate, eingesetzt würden.

Der anschließend an die Enzymsäule eingebaute Ionenaustauscher wird nach Ende der Synthese gründlich mit H_2O ausgewaschen und dann mit 0,1 M H_2SO_4 eluiert. Die Fraktionen werden mit HPLC-System A auf ihren Gehalt an SAM geprüft, vereinigt und mit festem $\text{Ba}(\text{OH})_2$ auf pH 5-6 eingestellt. Das ausgefallene BaSO_4 wird abzentrifugiert, in H_2O resuspendiert, um das in beträchtlicher Menge mitgerissene SAM zurückzugewinnen, und erneut abzentrifugiert. Das im Überstand enthaltene SAM wird gefriergetrocknet.

Mit dem an CPG-10 immobilisierten Enzym wurden so 5 mmol SAM hergestellt (2,5 g berechnet als SAM-HSO_4).

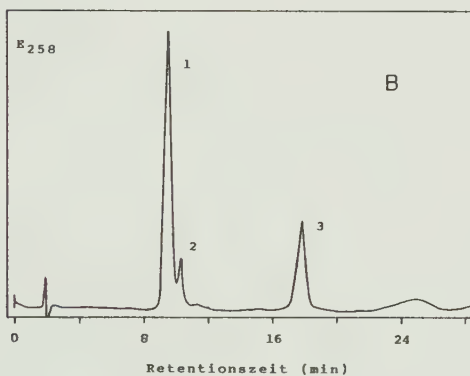
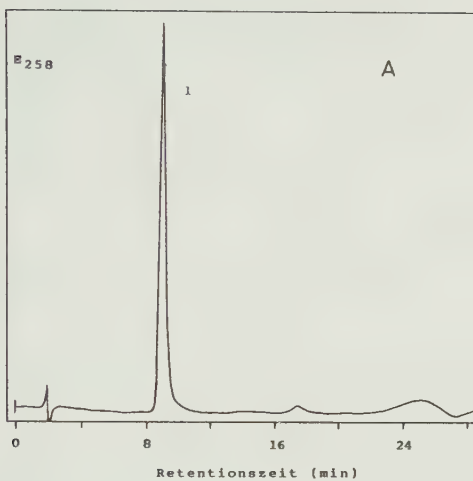
Entsprechende Ansätze werden mit dem an CH-Sepharose gebundenen Enzym durchgeführt, von dem 400 nkat in eine Säule 1,5 cm $\varnothing$ x 4 cm gepackt sind. Bei diesen Synthesen werden aber nur Umsätze bis zu 45% des eingesetzten ATP erreicht, obwohl beide Säulen vergleichbare Aktivitäten besitzen und die Flußrate mit 1,2 $\mu\text{mol/min}$ (ATP) ebenfalls gleich ist. Eine Erklärung könnte sein, daß hier zum Einen äquimolare Mengen ATP und Methionin (3 mM) eingesetzt wurden, womit es bei hohen Umsatzraten zu einer Verarmung an beiden Substraten und damit zu einer noch schnelleren Abnahme der Reaktionsge-

schwindigkeit kommt, und zum Anderen auch an den Säulenabmessungen. Bei der ausgeprägten Produkthemmung des Enzyms ist die Säule mit großem Durchmesser und dünnem Gelbett der umgekehrten Variante deutlich überlegen, bei der der Großteil des Enzyms durch das am Säulenanfang produzierte SAM blockiert wird. Errechnet aus der produzierten Menge SAM sind nur 2% der im Standardtest ermittelten Aktivität in der Säule letztlich aktiv. In verschiedenen Läufen sind mit dieser Säule 1,5 mmol SAM hergestellt worden (0,75 g berechnet als SAM- HSO_4).

Der Gehalt an SAM wird photometrisch bestimmt. $E_{259} = 15,4$ für eine 1 mM Lösung SAM in H_2O (GROSS et al., 1983). Die Reinheit wird mit DC in Laufmittel 1 und 2 und mit den HPLC-Systemen A und B kontrolliert. Bei der DC sind außer SAM keine anderen Flecke und bei der HPLC, auch bei starker Überladung der Säule, keine weiteren Peaks zu erkennen. In dieser Hinsicht ist das SAM sauber. Der Gehalt an eventuell verschleppten anorganischen Salzen ist aber nicht bekannt. Ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme von enzymatisch hergestelltem SAM und kommerziellem SAM von Sigma zeigt deutlich die Qualitätsunterschiede (Abb. 11).

1.5 Synthese von $^{14}\text{CH}_3$ - und C^3H_3 -SAM

Der bedeutendste Unterschied zu den oben dargestellten Synthesen liegt in den geringen Substanzmengen, mit denen bei radioaktiven Umsetzungen hantiert wird. Daneben ist man bestrebt, den apparativen Aufwand so gering wie möglich zu halten. Für solche miniaturisierten Synthesen scheint ein Batch-Verfahren das geeignetste zu sein. Als Substrat wird Methionin verwendet, das in der Methylgruppe radioaktiv markiert und von der höchst möglichen spezifischen Radioaktivität ist. Die Reaktion wird in dem Originalgefäß, in dem das $^{14}\text{CH}_3$ - bzw. C^3H_3 -Methionin geliefert wird, durchgeführt.



Vergleich der Reinheit von enzymatisch synthetisiertem SAM (A) und kommerziellem (Sigma) (B). Auftrennung mit HPLC-System B (s.S. 26). Von jeder Probe werden 20 nmol injiziert. 1 SAM, 2 SAH, 3 unbekannte Verunreinigung.

Abb. 11

Folgende Bestandteile sind in den Ansätzen enthalten:

	C^3H_3			$^{14}CH_3$		
Methionin	1 ml	5 mCi	59 nmol	0,5 ml	250 μ Ci	4,2 μ mol
ATP		1,7 mM	5 μ mol		33 mM	100 μ mol
KCl		30 mM			30 mM	
MgCl ₂		50 mM			50 mM	
CPG-10 immobilisierte						
SAM-Synthetase	50	pkat			2	nkat
Volumen ca.	3	ml			5	ml

Mit 1 M Tris pH 8,5 wird der Ansatz auf pH 7,5 eingestellt (pH-Papier), bevor das gründlich mit H₂O gewaschene, an CPG-10 gebundene Enzym dazu gegeben wird.

Das Volumen der Ansätze wird so gering wie möglich gehalten, und hängt vor allem von dem Volumen der Glassuspension ab. Die zugesetzte Menge Enzym reicht aus, die Reaktion innerhalb von 2-3 Stunden zu beenden. Der Verlauf der Reaktion wird mit DC in Laufmittel 1 und 2 verfolgt, während die Ansätze auf einem Rotationsschüttler (IKA) mit etwa 100/min bei Raumtemperatur bewegt werden.

Nach dem Ende der Reaktion wird das immobilisierte Enzym in eine Plastikspritze gefüllt und mit möglichst wenig H₂O (ca. 5-7 ml) ausgewaschen. Das SAM haftet recht hartnäckig an dem immobilisierten Enzym, weswegen nicht zuviel davon eingesetzt werden sollte, oder zuletzt mit 0,5 N HCl nachgewaschen wird, wobei allerdings das Enzym zerstört wird. Die Lösung wird mit HCl auf pH 3,5 (pH-Papier) eingestellt und bei -20°C gelagert.

In der Regel werden für 3H 97-99 % der Radioaktivität zurückerhalten und für ^{14}C 93-95 %. Die Reinheit des radioaktiven SAM wird wiederum mit DC (Laufmittel 1 und 2) bestimmt. Je nach Reinheit des verwendeten Methionins, das sich in gelöster Form in dieser hohen spezifischen Radioaktivität sowohl bei -20°C als auch bei +6°C innerhalb weniger Monate zersetzt, finden sich zwischen 70 und 90 % der Radio-

aktivität auf Höhe der SAM Referenz. Das SAM enthält daneben noch alle Bestandteile des Reaktionsansatzes. Eine Reinigung, etwa an SP-Sephadex oder Amberlite CG-50 ist prinzipiell möglich, aber mit hohen Verlusten verbunden. Für die vorgesehene Verwendung des SAM sollten diese Verunreinigungen kein Problem darstellen.

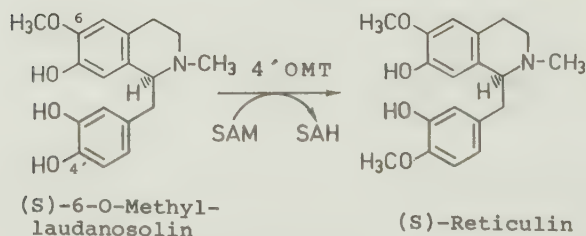
Im Rahmen dieser Arbeit wurden 4 x 5 mCi C^3H_3 -Methionin und 5 x 250 μ Ci $^{14}CH_3$ -Methionin umgesetzt.

2. S-Adenosyl-L-Methionin: 6-O-Methylaudanosolin 4'-O-Methyltransferase (4'OMT)

In den ersten Schritten der Biosynthese der Benzylisochinolin Alkaloide kommt es zu einer Reihe von Methylierungen des primär gebildeten Norlaudanosolins oder Norcocclaurins (s.S. 7). Eine 6-O-Methyltransferase (6 OMT) aus Argemone platyceras Zellkulturen wurde von RÜFFER et al., (1983a) beschrieben. Dieses Enzym zeigte seine höchste Aktivität und Affinität gegenüber Norlaudanosolin, wobei es nicht zwischen den Stereoisomeren unterscheidet. Die isolierte Enzympräparation methylierte außerdem auch die Position 7 in geringerem Ausmaß, was auch von der aus Schweineleber isolierten Catechol-O-Methyltransferase (COMT) bekannt ist (COWARD et al., 1973).

Auch für die Methylierung des Benzylteils dieser Alkaloide wurde von RÜFFER et al., (1983c) ein Enzym beschrieben, das dort in 3'-Stellung angreift und zum Orientalin führt, aber für den Weg zum Reticulin nicht relevant ist.

Das Enzym, das in diese Richtung, zu dem zentralen Verzweigungspunkt der Isochinolin Alkaloide leitet und die 4'-Stellung methyliert, soll im Folgenden untersucht werden.



Reaktion, die durch die 6-O-Methylaudanosolin 4'-O-Methyltransferase katalysiert wird.

Abb. 12

Zellkultur	Alter	4 °OMT		6 OMT		NMT	
		pkat/mg nkat/1		pkat/mg nkat/1		pkat/mg nkat/1	
		Protein	Medium	Protein	Medium	Protein	Medium
Berberidaceae							
B.henryana	5 d	15.7	15	10.9	10.3	23.3	22.2
B.koetineana	5 d	9.6	10	9.4	9.6	42.5	44.5
B.stolonifera V 29	5 d	7.2	5.5	4.0	3.0	6.9	5.3
B.wilsoniae	6 d	12.2	5.0	-	-	7.2	3.0
B.beaniana	6 d	9.2	4.3	-	-	15.2	7.1
B.taliensis	4 d	8.7	4.2	-	-	13.1	6.3
B.carminea	4 d	6.1	2.3	-	-	3.6	1.4
B.brettschneideri	4 d	5.8	0.9	-	-	20.8	3.2
B.crataegina	4 d	4.1	0.9	-	-	7.4	1.6
B.stenophylla	4 d	3.5	1.5	-	-	1.8	0.8
B.dictophylla	4 d	3.4	2.0	-	-	4.6	2.7
B.julia	4 d	2.8	2.5	-	-	5.5	4.9
B.nobilis	5 d	2.3	0.4	-	-	4.2	0.7
B.gagnepainii	5 d	2.2	0.8	-	-	6.6	2.4
B.vulgaris	4 d	2.2	0.3	-	-	4.5	0.6
B.angulosa	4 d	1.8	1.7	-	-	8.2	8.0
B.atropurpurea	4 d	1.2	0.2	-	-	7.7	1.3
B.turcomanica	4 d	1.0	0.7	-	-	1.6	1.1
B.laxifolia	4 d	0	0	-	-	12.1	1.8
B.heteropoda	4 d	0	0	-	-	0	0
Mahonia nervosa	5 d	7.6	5.6	2.7	2.0	3.8	2.8
Podophyllum peltatum	7 d	2.9	1.5	2.6	1.3	2.2	1.1
Podophyllum hexandrum	7 d	2.8	1.7	2.4	1.5	2.5	1.5
Ranunculaceae							
Thalictrum minus	5 d	0	0	0	0	0	0
T. dipterocapum	5 d	1.4	0.8	1.5	0.9	3.3	3.0
Coptis japonica	5 d	6.4	4.7	5.9	4.2	0.7	0.5
Papaveraceae							
Bocconia cordata	5 d	4.8	0.9	9.9	1.9	1.4	0.3
Glaucium flavum	7 d	5.3	1.6	7.1	2.1	3.2	1.0
Glaucium corneculatum	7 d	3.5	1.3	3.5	1.3	2.9	1.1
Glaucium elegans	7 d	0.5	0.2	0.4	0.1	0.5	0.2
Eschscholtzia glauca	6 d	3.0	1.2	3.1	1.2	0.7	0.3
E. californica	7 d	5.5	4.3	8.0	6.3	1.3	1.0

Zellkultur	Alter	4'OMT		6 OMT		NMT	
		pkat/mg	nkat/l	pkat/mg	nkat/l	pkat/mg	nkat/l
		Protein	Medium	Protein	Medium	Protein	Medium
<i>E. marginata</i>	7 d	0	0	0	0	0	0
<i>Argemone platycera</i>	5 d	1.9	0.1	-	-	3.9	0.1
<i>Fumariaceae</i>							
<i>Corydalis vaginans</i>	6 d	3.3	2.4	5.9	4.2	0.7	0.5
<i>Fumaria officinalis</i>	6 d	1.0	0.4	1.3	0.6	0	0
<i>Menispermaceae</i>							
<i>Tinospora caffra</i>	5 d	0	0	5.9	2.1	21.5	7.7
<i>Stephania dela</i>	5 d	0	0	2.5	1.0	2.4	1.0

Tabelle 4 Vorkommen der 4'-O-Methyltransferase, 6-O-Methyltransferase und N-Methyltransferase in Zellsuspensionskulturen. Die Enzymaktivitäten werden mit den Standardtests bestimmt.

2.1 Verbreitung der 4'-O-Methyltransferase in Zellkulturen

Um eine geeignete Quelle für die Gewinnung des Enzyms zu finden, und um seine Bedeutung für die Biosynthese der Benzylisochinoline zu demonstrieren werden eine Reihe von Zellkulturen, die für ihren Gehalt an diesen von Reticulin abgeleiteten Alkaloiden bekannt sind, untersucht.

Dazu werden von 4 bis 7 Tage alte Kulturen je 5 g tiefgefrorenes Gewebe in 10 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7,8 mit 20 mM Mercaptoethanol aufgeschlossen (s.S. 19). Zur Abtrennung der Alkaloide werden je 1 ml des Rohextraktes mit 100 µl dextranbeschichteter Kohlesuspension (0,5 g Dextran + 5 g Aktivkohle in 100 ml H₂O) gemischt und nach 5 Minuten abzentrifugiert. Die Enzymaktivitäten der 4'OMT, der N-Methyltransferase und bei einigen auch der 6 OMT werden mit den Standardtests (s.S. 21) in dem fast farblosen Überstand bestimmt.

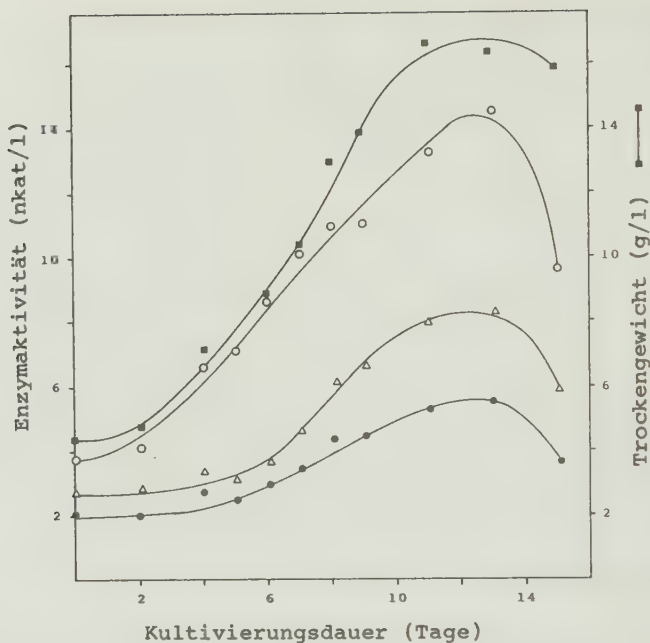
Einschränkend muß zum Ergebnis dieser Übersicht beachtet werden, daß der verwendete Test keine genaue Aussage über die Position der Methylierung zuläßt, wenn auch die Möglich-

keiten durch die Wahl der Substrate eingeschränkt sind. Die 4'OMT zeigt eine weite Verbreitung, wobei es aber keine festen Beziehungen zu den beiden anderen, an der Reticulin Biosynthese beteiligten Enzymen zu geben scheint, nachdem es einige Spezies gibt, bei denen ein Enzym nicht nachweisbar ist, oder nur schwach aktiv ist, und die Verhältnisse der Enzymaktivitäten zueinander stark schwanken. Die Gattung Berberis steht einmal mehr als Spitzenreiter in Bezug auf produzierte Enzymaktivität je Liter Kulturmedium fest, was sowohl auf den höheren Enzymanteil am Gesamtprotein, als auch das gute Wachstumsverhalten dieser Kulturen zurückgeht. Für die Gewinnung der 4'OMT wird Berberis koetineana gewählt (B. henryana wurde erst später etabliert, nachdem bereits mit B. koetineana gearbeitet wurde).

2.2 Kinetik der Bildung der 4'-O-Methyltransferase in Berberis koetineana

Nicht nur die Auswahl des geeignetsten Gewebes ist zum Erreichen einer guten Ausbeute bei der Enzymgewinnung von Bedeutung, sondern die Zellkultur muß auch zum richtigen Zeitpunkt geerntet werden, da der Enzymgehalt sich mit der Entwicklung und Alterung der Kultur verändern kann. Für diesen Versuch werden 22 l 1 Erlenmeyerkolben mit genau gleichen Mengen Gewebe inokuliert (Steril und schonend abfiltrierte, 7 Tage alte Zellen, 9 g Frischgewicht, 420 mg Trockengewicht). Jeden bzw. jeden zweiten Tag werden zwei der Kolben geerntet und das Gewebe tiefgefroren. Der Verlauf der Frischgewicht- und Trockengewichtszunahme wird registriert. Die Enzymaktivitäten der drei Methyltransferasen werden, genauso wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, nach Ende der Kinetik gemeinsam bestimmt (Abb. 13).

Die spezifischen Aktivitäten der drei Methyltransferasen im Rohextrakt fallen zu Beginn der Kultivierung ab und steigen während der log. Wachstumsphase der Kultur wieder an, um kurz vor deren Ende erneut abzufallen. Alle drei Enzyme verhalten sich in diesem zeitlichen Verlauf etwa gleich. Die



Zunahme des Zelltrockengewichtes und der Aktivitäten der Methyltransferasen während der Kultivierung von *Berberis koetianensis* Suspensionszellkulturen.

△-△ N-Methyltransferase, ○-○ 4-O-Methyltransferase, ●-● 6-O-Methyltransferase. Die Anzucht erfolgt in 1 l Erlenmeyerkolben.

Abb. 13

höchsten Ausbeuten an Enzymaktivität können am Ende der Wachstumsperiode zwischen dem 11. und 13. Tag geerntet werden. Ein markantes Maximum der Gesamtzymaktivität, wie es z.B. für das Berberinbrücken-Enzym beschrieben wird (STEFENS, 1984), ist nicht zu beobachten.

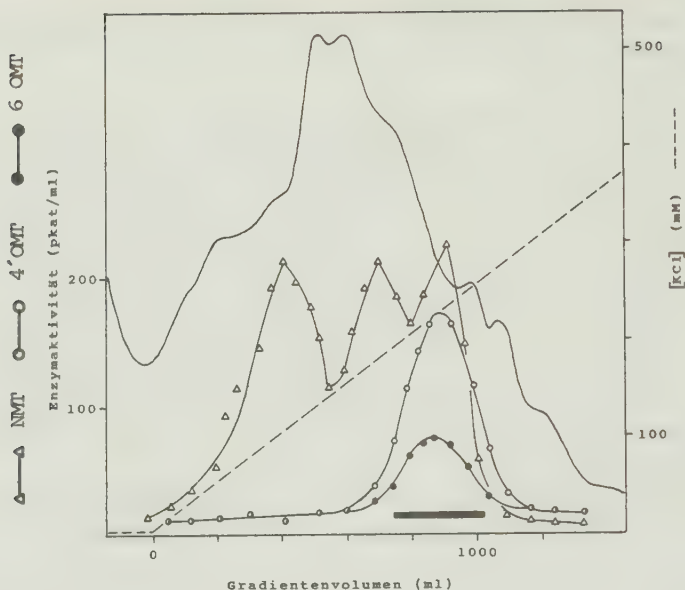
2.3 Reinigung der 4'-O-Methyltransferase aus Berberis koetianeana

Ausgangspunkt für die Reinigung der 4'OMT ist 1 kg Frischgewicht (71 g Trockengewicht) Gewebe, das nach 12 Tagen Kultivierungsdauer geerntet worden ist, und das wie beschrieben aufgeschlossen wird (s.S. 19). Alle Schritte werden im Kühlschrank bei 6-10°C oder im Eisbad durchgeführt. Als Standardpuffer dient in diesem Reinigungsgang 20 mM Phosphatpuffer pH 8 mit 20 mM Mercaptoethanol. Das Minimalziel der Reinigung der 4'OMT soll es sein, sie von den anderen beiden, an der Reticulin Biosynthese beteiligten 6 OMT und NMT abzutrennen. Deshalb werden diese beiden Enzyme in den Säulen Eluaten mitverfolgt.

Der erhaltene Rohextrakt ist durch Protoberberine intensiv gelb-orange gefärbt, vor allem durch Jatrorrhizin, das für seine starke Hemmwirkung auf alle an seiner Biosynthese beteiligten Enzyme bekannt ist. Die Abtrennung der Alkaloide gelingt mit XAD (Säule: 2,5 cm Ø x 25 cm), das ein Adsorbens für phenolische Strukturen darstellt, ohne Verluste an Protein. Der Durchlauf dieser Säule ist nur noch schwach gelb gefärbt, und zeigt im Standardtest etwa die doppelte Enzymaktivität des Rohextraktes. Eine zeit- und arbeitsaufwendige Aufkonzentrierung des Rohextraktes, etwa durch Ammoniumsulfat Fällung, erfolgt nicht.

2.3.1 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel

An die XAD-Säule wird direkt eine ausreichend dimensionierte DEAE-Säule (5 cm Ø x 20 cm; 400 ml Gelbett) angeschlossen, so daß beide Säulen in einem Gang betrieben werden können. Die Flußrate beträgt 4 ml/min. Bei 2 l Rohextrakt dauert das ca. 8,5 Stunden. Beide Säulen werden vorher mit Aufschlußpuffer äquilibriert. Die XAD-Säule wird nach der Aufgabe des Rohextraktes aus dem Chromatographiesystem ausgebaut, und die Elution der DEAE-Säule erfolgt mit einem linearen Gradienten mit dem Aufschlußpuffer als Startkomponente und



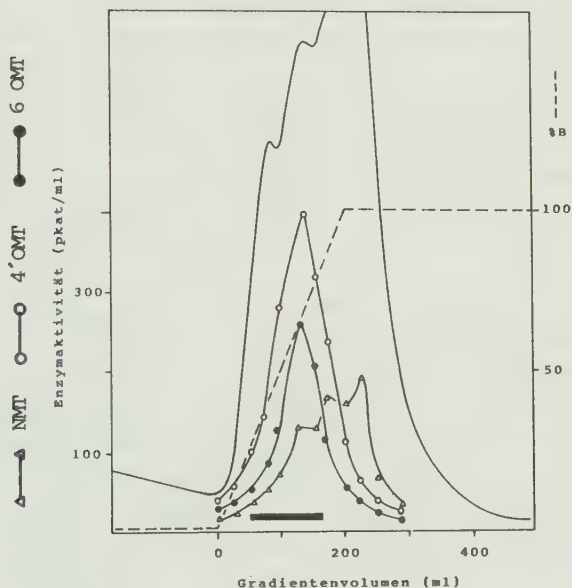
Elutionsprofil der DEAE-Sephacel Säule (5 cm $\varnothing$ x 20 cm). Flußrate 4 ml/min. Der Startpuffer ist Standardpuffer, der Elutionspuffer enthält 1 M KCl in Standardpuffer. Steigung des Gradienten 25 mM / 100 ml. Der durch den Balken gekennzeichnete Bereich wird für die weitere Reinigung zusammengefaßt. Die Enzymaktivität wird im Standardtest ermittelt.

Abb. 14

Standardpuffer mit 1 M KCl als Eluent, in einem Volumen von 1600 ml auf 0,4 M KCl (25mM/100ml). In einem weiteren Schritt geht der Gradient in 200 ml bis auf 1 M KCl, zum Regenerieren der Säule. Die 4'OMT findet sich im Bereich um 220 mM KCl. Diese Fraktionen werden vereinigt.

2.3.3 Hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose

Das Eluat der DEAE wird auf 15% Sättigung Ammoniumsulfat eingestellt und auf eine mit 15% Ammoniumsulfat in Standardpuffer äquilibrierte Phenyl-Sepharose Säule (5 cm ϕ x 10 cm; 200 ml Gelbett) aufgepumpt. Die Säule wird mit einem linearen Gradienten eluiert, in dem Standardpuffer mit 30% Ethylenglycol als Eluent dient. Das Gradientenvolumen be-



Elutionsprofil der Phenyl-Sepharose Säule (5 cm ϕ x 10 cm). Flußrate 2 ml/min. Der Startpuffer enthält 15% Sättigung Ammoniumsulfat in Standardpuffer, der Elutionspuffer B enthält 30% Ethylenglycol in Standardpuffer. Der durch den Balken gekennzeichnete Bereich wird für die weitere Reinigung zusammengefaßt. Die Enzymaktivität wird im Standardtest ermittelt.

Abb. 15

trägt 200 ml, die Flußrate 2 ml/min . Ethylenglycol führt zu einer besseren Auftrennung der Proteine, die sonst in einem größeren Volumen von der Säule schmieren. So eluiert die 4'OMT etwa in der Mitte des Gradienten. Die aktiven Fraktionen werden durch eine 0,8 µm Membran partikelfrei filtriert und anschließend mit einer Druckfiltration an einer YM-10 Membran (Amicon) auf etwa 10 ml eingengt.

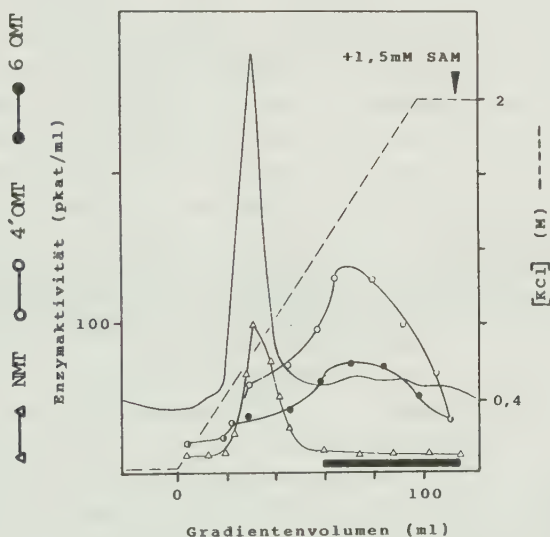
2.3.3 Gelfiltration an TSK-Fraktogel

Die Trennleistung einer Gelfiltration hängt nicht zuletzt von dem Volumen der Probe ab. Deshalb wird das Konzentrat der Druckfiltration in zwei Läufen zu je etwa 5 ml auf einer TSK-Fraktogel Säule (2,4 cm Ø x 85 cm; 385 ml Gelbett) mit einer Flußrate von 0,25 ml/min aufgetrennt. Die Säule ist mit Standardpuffer äquilibriert. Nach 190 ml tritt die 4'OMT aus der Säule aus, die aktiven Fraktionen beider Läufe werden vereinigt.

2.3.4 Affinitätschromatographie an SAH-Sepharose

SAH, das Reaktionscoprodukt aller SAM-abhängigen Methyltransferasen zeichnet sich durch seine hohe Affinität zu diesen Enzymen aus, woraus eine wirksame kompetitive, reversible Inhibierung resultiert. Diese hohe Affinität kann man sich in einem Reinigungsverfahren zunutze machen, wenn es gelingt SAH fest, aber für das Enzym gut zugänglich an eine Matrix zu binden. Die beiden primären Aminogruppen können als Amide an einen mit Carboxylgruppen derivatisierten Träger kovalent angebunden werden, und die Carboxylgruppe umgekehrt an einen mit freien Aminogruppen. Die andere Voraussetzung wird durch Spacer erfüllt, die dem SAH einen gewissen Abstand (6 C-Atome) von der Matrix und eine gewisse Beweglichkeit geben, die nötig sein mögen, um mit einem Enzym in Wechselwirkung treten zu können. Die Herstellung der Affinitätsmedien ist vorher beschrieben worden (s.S. 27). In Vorversuchen ist die Tauglichkeit dieser Trennmedien ge-

testet worden. Dabei stellt sich heraus, daß die Aminogruppen von SAH für die Bindung der 4'OMT offenbar von Bedeutung sind, denn eine Bindung des Enzyms an die SAH-CH-Sepharose, in der diese Gruppen blockiert sind, gelingt nicht. Das zeigt auch, daß es deutliche Unterschiede im Bereich der aktiven Zentren verschiedener Methyltransferasen geben muß, da mit einer solchen Säule bereits erfolgreiche Reinigungen von Methyltransferasen durchgeführt wurden (z.B. IZZO und GANTT, 1977). Die Bindung an den Aminohexyl-Sepharose Träger, der das SAH an seiner Carboxylgruppe gebunden trägt, gelingt,



Elutionsprofil der SAH-AH-Sepharose Säule (1 cm Ø x 4 cm). Flußrate 0,4 ml/min. Startpuffer ist Standardpuffer, der Elutionspuffer enthält 2 M KCl in Standardpuffer. Steigung des Gradienten 20 mM/ml. Der Pfeil markiert den Beginn der Inkubation mit 1,5 mM SAM in Elutionspuffer. Der durch den Balken gekennzeichnete Bereich wird für die weitere Reinigung zusammengefaßt. Die Enzymaktivität wird im Standardtest ermittelt.

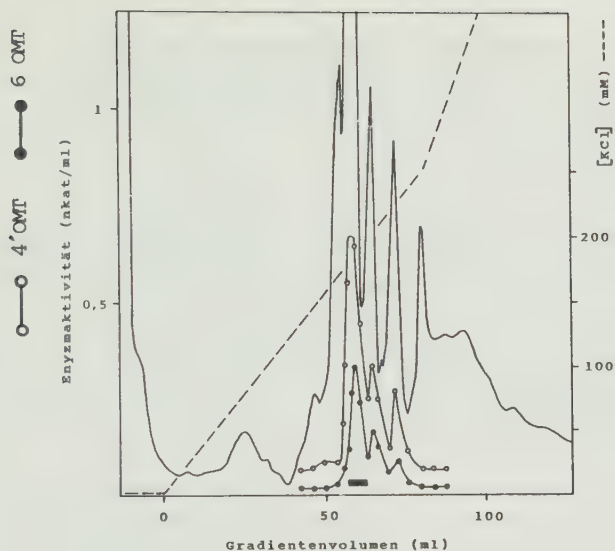
Abb. 16

ebenso die Desorption des Enzyms mit hoher Ionenstärke. Die aktiven Fraktionen des Gelfiltrationsschrittes werden sehr langsam, mit 0,1 ml/min, auf eine kleine, mit Standardpuffer äquilibrierte SAH-AH-Sepharose Säule (1 cm $\varnothing$ x 4 cm; 3,5 ml Gelbett) aufgepumpt. Vor der Elution wird die Säule noch 2 Stunden mit der Enzymlösung stehen gelassen, um eine vollständige Bindung der Methyltransferase zu ermöglichen. Mit einem linearen Gradienten bis 2 M KCl in Standardpuffer in einem Volumen von 100 ml (20 mM/ml) bei einer Flußrate von 0,4 ml/min wird die Affinitätssäule eluiert. Zu Beginn des Gradienten wird der Hauptteil des gebundenen Proteins abgelöst, das möglicherweise über unspezifische Wechselwirkungen festgehalten worden war. Die letzten Reste von NMT, die noch bis hierher verschleppt worden sind, lösen sich ebenfalls schon am Anfang des Gradienten von der Säule. Die 4'OMT wird erst danach, ab etwa 0,8 M KCl abgelöst, und wäscht in einem großen Volumen langsam aus. Dieser aktive Teil des Eluates, der weniger als 10% des aufgetragenen Proteins enthält, wird gegen Standardpuffer (3 x 1 l; je 2 Stunden) dialysiert.

Da sich das Enzym nur sehr zögernd und möglicherweise nicht vollständig von der SAH-Säule trennt, werden nach dem KCl-Gradienten 5 ml dieses Elutionspuffers mit 1,5 mM SAM versetzt, und die Säule damit über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird mit weiteren 10 ml dieses Puffers nachgewaschen (0,1 ml/min). Auch dieses Eluat wird gründlich dialysiert (s.o.) und auf Aktivität getestet. Weitere 15% der mit dem KCl-Gradienten eluierbaren Aktivität lassen sich so noch dazugewinnen. Die beiden SAH-Säulen Fraktionen werden vereinigt. 70% der aufgegebenen 4'OMT-Aktivität gehen bei dieser Reinigungsstufe dennoch verloren.

2.3.5 Ionenaustauschchromatographie an Mono Q

Dieser Reinigungsschritt trennt nach den gleichen Prinzipien wie der DEAE-Schritt am Anfang. Dennoch hat er seine Berechtigung auf Grund der hohen Trennleistung des Mono Q Säulen-



Elutionsprofil der Mono Q Säule (0,5cm Ø x 5cm). Flußrate 1 ml/min. Startpuffer ist Standardpuffer, der Elutionspuffer enthält 0,5 M KCl in Standardpuffer. Steigung des Gradienten 3,1 mM/ml. Der durch den Balken gekennzeichnete Bereich wird zusammengefaßt. Die Enzymaktivität wird im Standardtest ermittelt.

Abb. 17

materials. Zusammen mit der nur geringen Proteinkapazität (max. 5 mg) ist diese Säule ideal geeignet für die Endreinigung von Enzymen, und dient auch der Konzentrierung der stark verdünnten SAH-Säuleneluat. Die Säule (0,5 cm Ø x 5 cm; 1 ml Gelbett) wird mit Standardpuffer äquilibriert und die Probe wird mit 1 ml/min aufgegeben. Die Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten auf 0,25 M KCl in Standardpuffer in 80 ml (3,1 mM/ml) Volumen. Die 4'OMT liegt im Bereich um 185 mM KCl. Die aktiven Fraktionen werden wieder gegen Standardpuffer dialysiert. Beachtenswert sind die beiden

kleinen Nebenaktivitäten, die bei 200 und 225 mM als deutlich getrennte Peaks im UV-Chromatogramm eluieren. Auch in diesen Nebenaktivitäten finden sich beide O-Methyltransferasen gemeinsam und etwa im selben Verhältnis wie in der Hauptaktivität wieder.

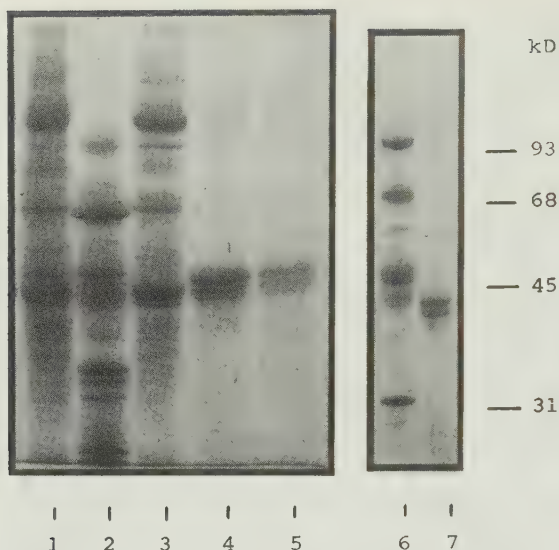
Damit ist ein typischer Reinigungsgang für die 4'OMT beendet, in dessen Verlauf 99,8% der ursprünglichen Proteinmenge abgetrennt werden. Er dauert etwa 5-6 Tage und liefert ein knapp 400-fach angereichertes Enzym in Ausbeuten deutlich unter 10% der Ausgangsaktivität. Die einzelnen Daten sind aus der Reinigungstabelle 5 zu entnehmen, die eine wichtige Kontrolle der Effektivität der einzelnen Reinigungsschritte darstellt.

Wie aus den Chromatogrammen des Reinigungsganges zu erkennen ist, unterscheiden sich die drei verschiedenen NMT Aktivitäten in ihrem chromatographischen Verhalten ausreichend genug von der 4'OMT, um letztlich abgetrennt zu werden. In den Eluatn der SAH- und Mono Q Säule ist keine Aktivität der NMT nachweisbar. Die 6 OMT dagegen, läßt sich in keinem der verwendeten Verfahren von der 4'OMT trennen. Die Aktivitätsmaxima der beiden Enzyme fallen stets genau aufeinander, wie sich zuletzt besonders deutlich bei der hochauflösenden Trennung mit Mono Q zeigt. Die 6 OMT ist deswegen auch in die Reinigungstabelle aufgenommen worden, in der auch das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der beiden Enzyme angegeben wird. Es schwankt im Verlauf der Reinigung etwas, verändert sich aber nicht grundlegend. Auf die Problematik der Trennung dieser beiden Aktivitäten wird weiter unten noch eingegangen (s.S. 88).

Eine noch aussagekräftigere Beurteilung der Reinheit eines Proteins erlaubt die SDS-Gelelektrophorese. Die letzten Schritte der Reinigung sind damit analysiert worden (s.Abb. 18). Dieses Verfahren offenbart die Leistungsfähigkeit der Affinitätschromatographie, nach der erstmals nur noch sehr wenige Banden in der Probe auftreten. Der Protein-

		4' OMT				6 OMT				NMT		
Volumen Gesamt-Protein	(ml)	(mg)	Spezif. Aktivität	Gesamt-Aktivität	Ausbeute	Reinigung	Spezif. Aktivität	Gesamt-Aktivität	Ausbeute	Reinigung	Verhältnis Spez. Aktiv.	Gesamt-Aktiv.
			(pkat/mg)	(nkat)	(%)	(--fach)	(pkat/mg)	(nkat)	(%)	(--fach)	4' OMT/6 OMT	
Rohextrakt-XAD	1910	7560	8,8	66,2	100	1	5,8	43,6	100	1	1,5	132
DEAE-Sephacel	244	1250	23,5	29,5	45	3	9,5	11,9	27	1,5	2,5	8,5
Phenyl-Sepharose	102	206	102,5	20,9	32	12	20,1	4,1	9	3,5	5,1	3,4
TSK-Fractogel	27,5	59	270,6	15,9	24	31	43,3	2,6	6	7,5	6,2	1,0
SAH-AH-Sepharose	69	4,6	1096	5,0	8	125	367	1,7	4	63,5	3,0	0
Mono Q	6,3	1,0	3370	3,5	5	383	723	0,75	2	125	4,7	0

Tabelle 5 Übersicht über den Verlauf der Reinigung der 4'-O-Methyltransferase und der 6-O-Methyltransferase aus 1 kg FG (71 g TG), 12 Tage altem Gewebe von *Berberis koetiana* Zellkulturen. Die Aktivität der Enzyme wird mit den jeweiligen Standardtests ermittelt.



SDS-Gelelektrophorese der Fraktionen der letzten 3 Schritte im Reinigungsgang der 4'-O-Methyltransferase. TSK-Fraktogel (1), Fraktionen der SAH-AH-Sepharose: Proteinpeak bei 0,6 M KCl (3), Fraktion der O-Methyltransferasen ab 0,8 M KCl (4), Eluat nach Inkubation mit 1,5 mM SAM (5). Mono Q (7). Als Molekulargewichtsmarker sind Eichproteine von Bio-Rad (6) aufgetragen: Phosphorylase b (92,5 kD), Rinderserumalbumin (68 kD), Egg Albumin (45 kD), Carboanhydrase (31 kD) . (Bahn (2) enthält defekten Molekulargewichtsmarker.)

Abb. 18

peak zu Beginn des KCl-Gradienten bei dieser Säule gleicht in seinem Muster genau dem Eluat der vorangegangenen TSK-Säule, mit dem Unterschied, daß die Bande, die dann in dem SAH-Eluat auftritt, fehlt.

Nach der Mono Q Säule sind nur noch zwei, etwa gleich intensive und sehr dicht beieinander liegende Banden vor einem trotz der hoher Beladung des Gels praktisch reinen Hintergrund zu erkennen. Dies spricht für ein zwar außerordentlich "sauberes", aber nicht homogenes Protein. Die Vermutung liegt nahe, daß die beiden Banden den beiden O-Methyltrans-

ferase-Aktivitäten zuzuschreiben sind, ohne daß dies aber, etwa durch die Bestimmung der Enzymaktivität, nachzuweisen wäre.

2.4 Identifizierung des Reaktionsproduktes der 4'-O-Methyltransferase

Für den Nachweis der durch die 4'OMT katalysierten Methylgruppenübertragung wird 6-O-Methyllaudanosolin als Substrat verwendet, da für das in der enzymatischen Reaktion daraus entstehende Produkt Reticulin, einige sehr spezifische Nachweise zur Verfügung stehen. Daneben weist das Enzym diesem Substrat gegenüber seine höchste Aktivität auf (s.S. 78).

a) Dünnschichtchromatographie

Ein üblicher Testansatz (s.S. 21) mit 6-O-Methyllaudanosolin und ^{14}C -SAM 30.000 cpm, wird mit 5 pkat 4'OMT (Mono Q) 60 Minuten lang inkubiert und mit 300 μl Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird geteilt und mit DC in Laufmittel 3, 4 und 5 aufgetrennt. Vor allem Laufmittel 3 hat sich zur Trennung der verschiedenen methylierten Benzylisochinoline besonders bewährt. In allen Laufmitteln liegt die Radioaktivität genau auf der unmarkierten Referenzsubstanz Reticulin (R_f -Werte LM 3: 0,55; LM 4: 0,40; LM 5: 0,60). Das möglicherweise auch entstehende Orientalin (3'-O-Methyl) hat die R_f -Werte LM 3: 0,60; LM 4: 0,40; LM 5: 0,60, die also sehr ähnlich sind. LM 3 trennt die beiden Substanzen aber weit genug, um zu beurteilen, daß sicher kein Orientalin entsteht.

b) HPLC

Zwei Ansätze ohne markiertes SAM werden hergestellt. In 150 μl sind 100 nmol Substrat, 160 nmol SAM, 15 mM Ascorbat und 67 mM Hepes pH 8,2 enthalten. Als Substrate werden 6-O-Methyllaudanosolin und 6-O-Methylnorlaudanosolin eingesetzt und mit 35 pkat 4'OMT (Mono Q) 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle werden Ansätze ohne Enzym ebenso

untersucht, da die Substrate nicht sehr stabil sind und sich in dieser Zeit spontan zersetzen (nicht methylieren). Je 30 μ l der Ansätze werden ohne weitere Behandlung direkt mit HPLC-System C aufgetrennt und die auftretenden Peaks gesammelt. Weitere 30 μ l werden mit 15 nmol (das entspricht etwa der enzymatisch gebildeten Menge in diesem Aliquot) authentischem Reticulin (Retentionszeit: 12,0 min) bzw. 5 nmol Norreticulin (11,1 min) versetzt und ebenfalls analysiert. Die Cochromatographie mit den erwarteten Produkten liefert saubere schulterfreie Peaks und bestätigt so deren Identität. Orientalin (11,4 min) und Nororientalin (10,4 min) werden hier deutlich abgetrennt. Sie entstehen unter diesen Bedingungen nicht! Das Enzym ist also insoweit regiospezifisch für die 4'-Stellung des Substrates.

c) Massenspektrometrie

Die Messung mit Elektronenstoß Ionisation führt bei den Benzylisochinolininen zu einem völligen Auseinanderbrechen der Bindung C1-C9 zwischen dem Isochinolin- und Benzylteil, so daß kein Molekülpeak zu erkennen ist (SHAMMA, 1972). Die dominierenden Massenpeaks stammen von dem Isochinolinium-Fragment, an dem sich aber in der untersuchten Reaktion nichts geändert hat. Das Benzylfragment ist mit weniger als 10% Intensität oft schwer vor dem Hintergrund zu erkennen. Deswegen wird zusätzlich mit chemischer Ionisation gemessen, um den Molekülpeak zu erfassen.

Die gesammelten Peaks der HPLC (s.o.) werden mit NH_3 alkalisiert und 3 x mit 1 ml CHCl_3 extrahiert. Das CHCl_3 wird eingeeengt und der Rückstand zur Messung verwendet.

Das vermutete Reticulin (MG 330) aus der Umsetzung von 6-O-Methylaudanosolin (MG 316) mit 4'OMT und SAM, zeigt bei EI-Messung das Isochinolinium-Fragment m/z (relat. Intensität) 192 (100%) und nach Abspaltung der 6-O-Methylgruppe das Fragment m/z 177 (28%). Das zeigt, daß in den Ringen A und B keine weitere Methylierung stattgefunden hat. Die Benzylfragmente liegen bei m/z 137 (10%) und nach Abspaltung einer Methylgruppe bei m/z 122 (10%). Das zeigt, daß die neue

Methylgruppe in den Benzylteil des Moleküls eingeführt worden ist. Die CI-Messung ergibt den Molekülpeak m/z 330 (100%) und das Fragment m/z 192 (80%).

Für Norreticulín (MG 316), das aus der Umsetzung von 6-O-Methylnorlaudanosolin (MG 302) stammt, ergibt sich bei der EI-Messung m/z 178 (100%) und m/z 163 (24%) für das, gegenüber Reticulin um die N-Methylgruppe ärmere Isochinolinium-Fragment und ebenfalls m/z 137 (12%) für das Benzylfragment. Mit CI wird der Molekülpeak m/z 316 (100%) und das Fragment 178 (21%) gemessen.

Diese Daten stimmen genau mit denen authentischer Referenzsubstanzen überein.

d) Enzymatischer Nachweis von Reticulin

Mit dem von STEFFENS (1984) beschriebenen Berberinbrücken-Enzym steht eine sehr spezifische Nachweismethode für Reticulin zur Verfügung. Das Enzym akzeptiert im Ring C nur das Methylierungsmuster von Protosinomenin (Methoxygruppe im Ring A gegenüber Reticulin vertauscht in Stellung 7) und Reticulin, nämlich (3'-Hydroxy-4'-Methoxy) und auch nur das (S)-Stereoisomere.

Ein üblicher Testansatz (s.S. 21) mit 80 nmol (R,S)-6-O-Methylnorlaudanosolin und 100.000 cpm ^{14}C -SAM, wird mit 1,2 pkat 4'OMT (DEAE) und zusätzlich 6 pkat NMT versetzt und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. In diesem Nachweis wird als Substrat (R,S)-6-O-Methylnorlaudanosolin verwendet, weil zu diesem Zeitpunkt das bereits N-methylierte Substrat noch nicht verfügbar war. Der ganze Ansatz wird mit DC in Laufmittel 3 aufgetrennt. Das entstandene Produkt (R_f 0,5) wird mit MeOH von der Kieselgelfolie eluiert, unter N_2 eingedampft und in 100 μl H_2O gelöst.

Zu dieser Substanz werden 50 μl 0,3 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9 und 150 μl 0,15 pkat elektrophoretisch gereinigtes Berberinbrücken-Enzym (freundlicherweise von P. Steffens zur Verfügung gestellt) zugesetzt und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Wieder wird der gesamte Ansatz mit DC in Laufmittel 3 aufgetrennt. Die Radioaktivität liegt jetzt vollständig auf

Höhe der Referenz von Scoulerin (R_f 0,7). Die Tatsache, daß kein Reticulin zurückbleibt, bedeutet, daß es sich ausschließlich um (S)-Reticulin gehandelt haben kann. Die 4'OMT setzt also offenbar sehr stereoselektiv nur das (S)-Enantiomere um.

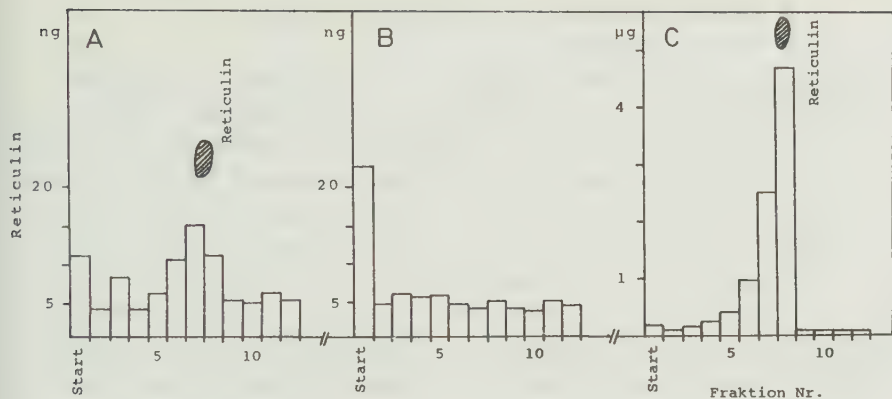
Die, der Reaktion der 4'OMT vorangehende N-Methylierung zum 6-O-Methylaudanosolin, erfolgt nicht stereoselektiv (s.S. 109), so daß diese Eigenschaft allein der 4'OMT zuzuschreiben ist.

e) Nachweis des Reaktionsproduktes der 4'OMT mit (R)- und (S)-Reticulin Radioimmunoassay (RIA).

Der RIA ist eine sowohl außerordentlich empfindliche als auch selektive Methode zur quantitativen Bestimmung und zum sicheren Nachweis von Substanzen. Zur Bestimmung von Reticulin stehen zwei derartige RIA, die von WIEZCOREK (1985) entwickelt wurden, zur Verfügung. Mit ihnen können das (R)- und das (S)-Enantiomere getrennt voneinander nachgewiesen werden, wobei die beiden Tests weniger als 0,1 % Kreuzreaktivität gegenüber dem anderen Enantiomeren aufweisen. Mit Ausnahme des Norreticulins werden auch andere, sehr ähnliche Benzylisochinoline mit diesen Tests nicht erfaßt.

Die Durchführung des RIA ist vorher beschrieben worden (s.S. 31).

In zwei getrennten Enzymsätzen werden in 300 µl Volumen 100 nmol (R)- und (S)-6-O-Methylaudanosolin mit 50 nmol SAM (nicht markiert), 15 mM Ascorbat und 67 mM Hepes pH 8,2 und mit 14 pkat 4'OMT (TSK) für 4,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Da die Substrate in den verwendeten Konzentrationen mit dem RIA doch geringfügig kreuzreagieren, werden Kontrollansätze ohne Enzym entsprechend behandelt. Aus demselben Grund werden die Ansätze nach Ende der Reaktion mit je 200 µl Ethylacetat extrahiert und räumlich gut voneinander getrennt, mit DC in Laufmittel 3 aufgetrennt. Für jede Probe werden die DC-Folien in 0,5 cm breite Streifen, parallel zur Laufmittelfront geschnitten und das Kieselgel über Nacht mit je 300 µl MeOH extrahiert. Die 1+3 mit H₂O verdünnten Ex-



Nachweis des Reaktionsproduktes der 4'OMT als Reticulin mit Hilfe des Radioimmunoassays, nach Auftrennung von Reaktionsansätzen mit DC, Laufmittel 3. Die DC-Folie wird in 0,5 cm breite Streifen geschnitten, die mit MeOH extrahiert werden. Für jede Fraktion der DC-Folie wird die gemessene Menge des jeweiligen Enantiomers an Reticulin angegeben.

(A) Messung mit (R)-Reticulin RIA: Der Ansatz enthielt (R)-6-O-Methylnorlaudanolin.

(B) Kontrolle zu (A) ohne Enzym.

(C) Messung mit (S)-Reticulin RIA: Der Ansatz enthielt (S)-6-O-Methylnorlaudanolin. Die Kontrolle zu diesem Ansatz ohne Enzym liegt über den ganzen R_f -Bereich unter der Nachweisgrenze.

Abb. 19

trakte werden mit beiden RIAs gemessen. Die Proben der Ansätze mit (S)-6-O-Methyllaudanosolin werden weiter auf 1/40 verdünnt.

(R)-Reticulin RIA: Der Ansatz mit (R)-6-O-Methyllaudanosolin zeigt auf Höhe des R_f -Wertes von Reticulin einen kleinen Ausschlag, der nur wenig über der Nachweisgrenze liegt, sich aber deutlich von den umgebenden Zonen der DC abhebt und etwa 50 pmol (R)-Reticulin entspricht. Der Ansatz mit (S)-6-O-Methyllaudanosolin liefert einen noch schwächeren Ausschlag, der zudem von der Kreuzreaktion des in erheblichen Mengen gebildeten (S)-Reticu-

lin stammen kann. Die Kontrollen bleiben alle dicht an der Nachweisgrenze.

(S)-Reticulin RIA: Der Ansatz mit (R)-6-O-Methylaudanosolin zeigt einen erstaunlich starken Ausschlag (etwa 1,2 nmol) im R_f -Bereich von Reticulin, woraus auf eine Verunreinigung des Substrates mit seinem (S)-Enantiomeren geschlossen werden muß. In dem Ansatz mit (S)-6-O-Methylaudanosolin werden 24,3 nmol (S)-Reticulin gemessen.

Aus den ermittelten Mengen des jeweiligen Reticulins ergibt sich ein mindestens 500-fach effektiverer Umsatz des (S)-6-O-Methylaudanosolin gegenüber seinem (R)-Enantiomeren durch die 4'OMT. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß, bei dem fast 50%-igen Umsatz von SAM in dem Ansatz mit (S)-6-O-Methylaudanosolin, die Enzymaktivität auf diesem Wege ermittelt nur einen Minimalwert darstellen kann.

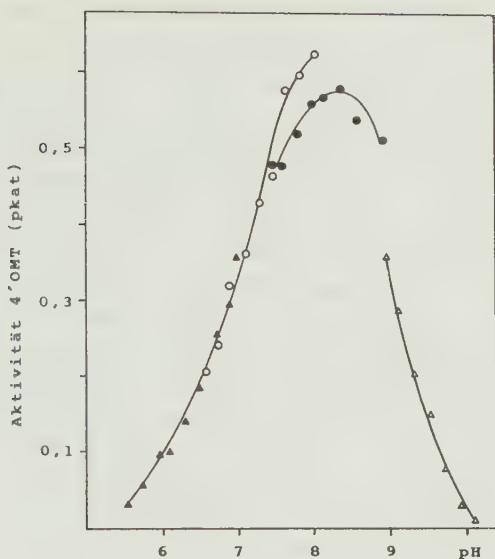
Die beiden letzten Nachweise (Berberinbrücken-Enzym und RIA) zeigen eindeutig, daß die 4'OMT nur die Methylierung der (S)-Enantiomeren katalysiert.

2.5 Eigenschaften der 4'-O-Methyltransferase

2.5.1 pH-Optimum

In Abhängigkeit von dem pH der umgebenden Lösung verändert sich die Protonierung von Aminogruppen des Enzyms, und auch der beiden Substrate, was sich auf die Interaktion der drei Partner auswirkt.

Zur Bestimmung dieser Kennzahl werden die üblichen Testansätze mit 0,6 pkat gereinigtem Enzym (Mono Q) und 0,5 M Pufferlösungen in 0,2 pH-Abstufungen verwendet, und der pH-Wert in den Reaktionsansätzen mit pH-Papier (Pehanon, Macherey Nagel) und Elektrode gemessen. Es ergibt sich ein Maximum in dem Bereich von pH 8,3-8,5, das damit deutlich über den Werten liegt, die für die meisten anderen Enzyme be-



Bestimmung der pH-Abhängigkeit der 4'-O-Methyltransferase. Verwendete Puffer (67 mM):

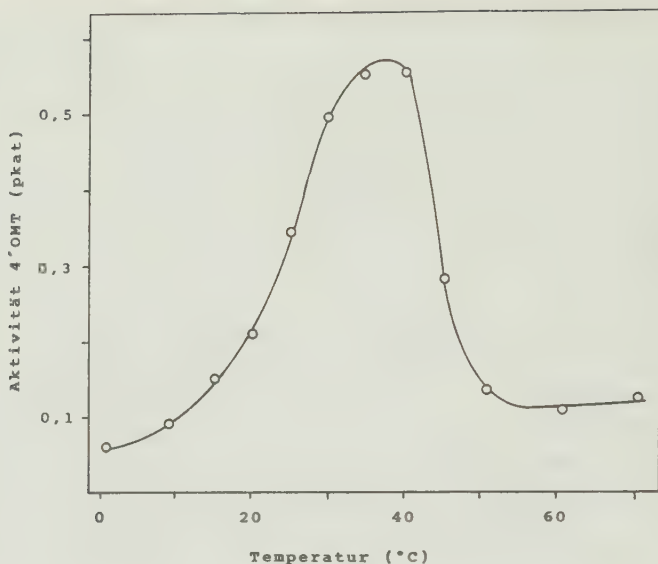
▲—▲ Citrat / NaOH, ○—○ Phosphat, ●—● Tricin, △—△ Glycin / NaOH. Die Aktivität wird im Standardtest mit 0,6 pkat 4' OMT ermittelt.

Abb. 20

schrieben wurden (um pH 7,5), die den nicht kompartmentierten Teil der Protoberberin Biosynthese katalysieren.

2.5.2 Temperatur-Optimum

Mit steigender Temperatur laufen chem. Reaktionen schneller ab. Dies gilt auch für die Gleichgewichtseinstellungen, die durch Enzyme katalysiert werden. In Konkurrenz zu dieser steigenden Enzymaktivität tritt die ebenfalls schneller ablaufende thermische Denaturierung der Proteine und die damit verbundene Inaktivierung. Diese beiden, sich überla-



Bestimmung des Temperatur-Optimums der 4'-O-Methyltransferase. 0,6 pkat Enzym werden im Standardtest für 10 Minuten bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

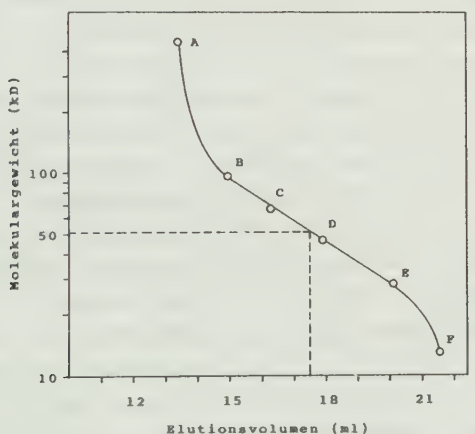
Abb. 21

gernden Vorgänge sind nur mit großem Aufwand voneinander getrennt zu erfassen. Die Messung erfolgt mit dem Standardtest und 0,6 pkat Enzym innerhalb von 10 Minuten. Das Maximum zwischen 35° und 40°C liegt im üblichen Rahmen.

2.5.3 Bestimmung des Molekulargewichts

Das gereinigte Enzym (Mono Q) wird mit SDS-Gelelektrophorese analysiert (s.S. 30 und Abb. 18). Der Vergleich mit parallel laufenden Markerproteinen bekannten Molekulargewichts erlaubt eine Zuordnung, wenn die 4'OMT genau einer Enzymbande zugeordnet werden kann. Wie bereits oben gezeigt, treten

hier aber zwei dicht nebeneinander liegende Banden in dieser Präparation auf, wobei nicht bekannt ist, welche davon der 4'OMT entspricht. Die Banden liegen in einem Bereich von 39.000 und 41.000 Dalton. Da mit denaturierenden und reduzierenden Agentien behandelt wurde, wird mit Hilfe der Gel-permeationschromatographie (s.S. 28) das Molekulargewicht im nativen Zustand des Enzyms ermittelt. Die Aktivität der 4'OMT eluiert nach 17,5 ml gemeinsam mit der 6 OMT und liegt genau unter dem Peak im UV-Chromatogramm. Aus dem Vergleich mit Markerproteinen ergibt sich mit dieser Methode ein Molekulargewicht von 51.000 Dalton. Die Abweichungen der beiden Methoden sind beträchtlich (bis 25%), sie zeigen aber, daß das Enzym nicht aus Untereinheiten aufgebaut ist.



Bestimmung des Molekulargewichtes der 4'-O-Methyltransferase mit Gelpermeations-HPLC (s.S. 28). Als Vergleich dienen Ferritin (450 kD) (A), Phosphorylase b (97 kD) (B), Rinderserumalbumin (68 kD) (C), Hühnerei Albumin (45 kD) (D), Carboanhydrase (29 kD) (E), Cytochrom C (12 kD) (F). Elutionsvolumen der 4'OMT: 17,5 ml; Molekulargewicht 51 kD.

Abb. 22

2.5.4 Isoelektrischer Punkt

Je nach ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden sich Proteine in ihrem Isoelektrischen Punkt, also jenem pH-Wert, bei dem sich nach außen hin die positiven und negativen Ladungen gerade ausgleichen, sie also in scheinbar ungeladener Form vorliegen.

Zur Bestimmung dieses Parameters stehen zwei Methoden zur Verfügung. Bei der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) wandern die Proteine in einem pH-Gradienten und in einem angelegten elektrischen Feld genau bis zu diesem pH-Wert und sammeln sich dort zu einer scharfen Bande. Bei der Chromatofokussierung wird ein im alkalischen Bereich äquilibrierter Anionenaustauscher (PBE 94) mit einem ampholythaltigen Puffer (Polybuffer 74) nach und nach in den sauren Bereich umtitriert. Dabei bildet sich in der Säule ein pH-Gradient aus, der langsam durch die Säule wandert. Die Proteine eluieren mit dem pH-Wert ihres isoelektrischen Punktes.

Die Durchführung der IEF ist vorher beschrieben worden (s.S. 29). Bevor die Probe aufgetragen wird, wird das Gel 2 Stunden mit 500 V vorfokussiert, um Ammoniumpersulfat aus dem Gel zu entfernen, das die Enzymaktivität völlig zerstört. Als Probe wird gereinigte 4'OMT (Mono Q) verwendet, die gegen 3 mM Standardpuffer dialysiert wird. 500 µl mit 140 pkat 4' OMT Aktivität werden eingesetzt. Das gefärbte Gel zeigt nur bei R_f 0,5 eine blaue Bande. In dem fraktionierten Gel finden sich in den zwei Fraktionen bei diesem R_f -Wert sowohl 4'OMT und 6 OMT Aktivität, die abermals genau aufeinander liegen. Der pH-Gradient, in einem dritten Gel bestimmt, liegt in diesem Bereich bei 4,9.

Zur Chromatofokussierung wird eine PBE-94 Säule (0,3 cm Ø x 25 cm; 7 ml Gelbett) mit 25 mM Imidazol/HCl pH 7,4 äquilibriert. 1 nkat vorgereinigte 4'OMT in 10 ml des Startpuffers werden aufgegeben und die Elution erfolgt mit 100 ml 1/8 verd. Polybuffer 74/HCl pH 3,9 mit 0,5 ml/min. 1,5 ml Fraktionen werden gesammelt. In ihnen wird der pH gemessen und

anschließend mit 0,5 ml 1 M Phosphatpuffer pH 8 der pH-Wert wieder angehoben, um das Enzym zu schonen. Die Enzymaktivität, die bei dieser Prozedur um etwa 80% abnimmt, eluiert bei einem pH von 4,7.

2.5.5 Substratspezifität der 4'OMT

Um eine Aussage über eine eventuelle Reihenfolge bei den verschiedenen Methylierungen zum Reticulin treffen zu können, ist die Aktivität der 4'OMT gegen die möglichen Intermediate von großem Interesse. Wie sich bereits in den oben dargestellten Versuchen mit 6-O-Methylaudanosolin gezeigt hat, ist das Enzym sowohl stereoselektiv für das (S)-Enantiomere als auch regiospezifisch bezüglich der beiden möglichen OH-Gruppen im Ring C. Nur die 4'-Stellung wird methyliert. Inwieweit das Methylierungs- und Hydroxylierungsmuster und das Benzylisochinolin Grundgerüst selbst einen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms haben, soll durch Inkubation mit den verschiedenen Substanzen getestet werden. Zur Quantifizierung der Aktivität werden diese Substanzen im Standardtest (167 µM) mit 1,6 pkat Enzym (Mono Q) bei 30 °C inkubiert. Wenn eine Substanz umgesetzt worden ist, wird das Reaktionsprodukt in der gleichen Weise mit HPLC untersucht, wie es für 6-O-Methylaudanosolin beschrieben wurde (s.S. 67). Auch hier wird durch Cochromatographie die Identität der Produkte bestätigt.

Durch die Anwesenheit der 6-O-Methyltransferase in der Enzympräparation kommt es natürlich zu zusätzlichen Reaktionen. Im Fall von Laudanosolin sind die beiden möglichen Enzymprodukte 6-O-Methylaudanosolin und 4'-O-Methylaudanosolin mit dem verwendeten HPLC-System C nicht zu trennen. Um das Reaktionsprodukt näher zu bestimmen, wird es massenspektrometrisch untersucht, wie es auf S. 68 für Reticulin beschrieben wurde. Eine Zuordnung der beiden methylierenden Aktivitäten zu einem der Enzyme geschieht willkürlich in der Art, daß Methylierungen im Ring A der 6-O-Methyltransferase zugeschrieben werden, solche im Ring C der 4'-O-Methyltrans-

Substrat	relative Aktivität	N	6	7	3'	Produkt
(R)- und (S)-Cocclaurin	0	H	OMe	OH	H	-
(R,S)-N-Methylcocclaurin	0	Me	OMe	OH	H	-
(R)-Norlaudanolin	24	H	OH	OH	OH	1)
(S)-Norlaudanolin	67	H	OH	OH	OH	1) 2)
(R,S)-Laudanosolin	84	Me	OH	OH	OH	4'-O-Methyl-laudanosolin
(R)-6-O-Methylaudanosolin	0	Me	OMe	OH	OH	-
(S)-6-O-Methylaudanosolin	100	Me	OMe	OH	OH	(S)-Reticulin
(R)-6-O-Methylnorlaudanolin	0	H	OMe	OH	OH	-
(S)-6-O-Methylnorlaudanolin	10	H	OMe	OH	OH	(S)-Norreticulin
(R,S)-7-O-Methyl-norlaudanolin	93	H	OH	OMe	OH	Norproto-sinomenin
(R,S)-Orientalin	0	Me	OMe	OH	OMe	-
(R,S)-Isoorientalin	0	Me	OH	OMe	OMe	-
Dopamin	0					-
Dihydroxyphenylacetaldehyd	0					-
2,3,9,10-Tetrahydroxy-tetrahydro- protoberberin	0					-

1) Es entsteht ausschließlich 6-O-Methylnorlaudanolin und/oder 4'-O-Methylnorlaudanolin. Die beiden Substanzen sind mit dem verwendeten HPLC-System C nicht zu trennen.

2) Zusätzlich wird auch Norreticulin gebildet.

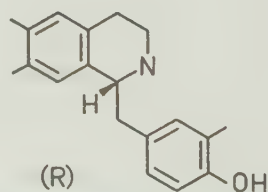
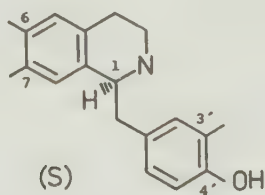


Tabelle 6 Zusammenstellung der Substanzen, die als Substrate der 4'-O-Methyltransferase getestet worden sind. Angegeben sind die im Standardtest mit 1,6 μ kat 4'OMT, 167 μ M Substrat bei 30°C ermittelten relativen Aktivitäten, bezogen auf (S)-6-O-Methyl-laudanosolin.

ferase. Auf diese Problematik wird weiter unten noch eingegangen (s.S. 87 ff).

Aus den Daten der Tabelle 6 ergibt sich eine enge Substratspezifität. Voraussetzungen für die Methylierung der 4'-Stellung sind das Benzylisochinolin Gerüst und die benachbarten OH-Gruppen im Ring C. Fehlt die OH-Gruppe an C-3' oder ist sie methyliert, bleibt die Reaktion aus. Die Methylierung in Ring A hat offenbar geringen Einfluß, nachdem 6-O-Methylaudanosolin und 7-O-Methylnorlaudanosolin etwa gleich gut umgesetzt werden.

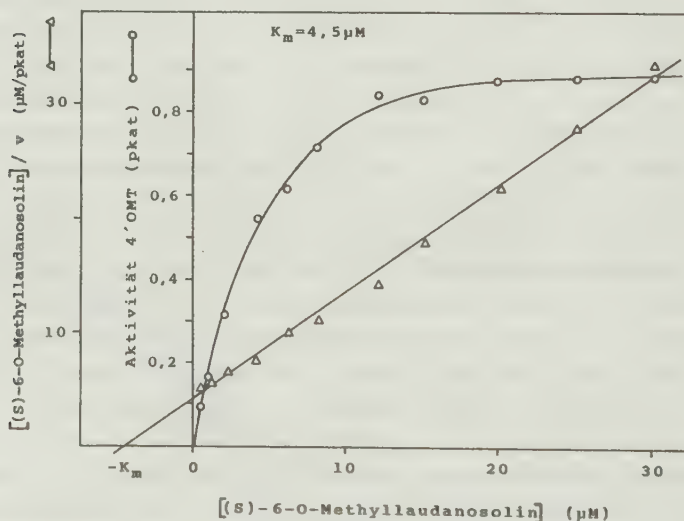
Wenn es sich bei letzterer auch um eine N-Norverbindung handelt, werden die N-methylierten Substrate deutlich besser umgesetzt, was nicht nur aus dem Vergleich zwischen (S)-6-O-Methylaudanosolin und (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin folgt, sondern auch zwischen Laudanosolin und Norlaudanosolin, wobei im Fall von (S)-Norlaudanosolin auch die Methylierung in Stellung 6 zu berücksichtigen ist. Die massenspektrometrische Untersuchung des Reaktionsproduktes von Laudanosolin mit der 4'OMT zeigt, daß ausschließlich die 4'-Stellung methyliert wird. Nur das Isochinolinium-Fragment mit m/z (relat. Intensität) 178 (100%) und 163 (5%) wird detektiert. Die entsprechenden Fragmente aus dem möglicherweise parallel entstandenen 6-O-Methylaudanosolin wären m/z 192 und 177. Sie können nicht nachgewiesen werden. Das Benzylfragment liegt bei m/z 137 (10%) und beweist die Methylierung im Ring C. Die gemessene Aktivität gegen Laudanosolin stammt also ausschließlich aus der Reaktion der 4'OMT.

Die in diesem Zusammenhang ebenfalls interessanten Substanzen 7-O-Methylaudanosolin und 6,7-O-Dimethylnorlaudanosolin bzw. deren N-Methylverbindung standen nicht zur Verfügung.

Nicht nur die Aktivität des Enzyms gegenüber einer Substanz ist ein Kriterium für die Beurteilung dieser Substanz als gutes oder schlechtes Substrat für dieses Enzym, sondern auch der K_m -Wert dieser Substanz..

Die K_m -Werte werden für die möglichen Konkurrenten in der

Biosynthese um dieses Enzym, 6-O-Methylnorlaudanolin und 6-O-Methylaudanolin, bestimmt. Wegen der Wechselwirkung mit der 6 OMT, ist dies für Norlaudanolin nicht möglich. Bei den Methylierungsreaktionen handelt es sich um Zwei-Substrat-Reaktionen, die zur Bestimmung des K_m -Wertes zweckmäßigerweise in Reaktionen pseudo-erster Ordnung überführt werden. Das bedeutet, daß das zweite Substrat SAM in sättigender Konzentration vorliegt, die sich während der Reaktion praktisch nicht verändert. Da SAM aber gerade die Meßgröße für den Ablauf der Reaktion darstellt, ist diese Forderung nur unter Einschränkung zu erfüllen. Die ermittelten Werte sind also den tatsächlichen Werten nur angenähert und gelten nur bei den angegebenen Bedingungen. Sie ermöglichen aber



Bestimmung des K_m -Wertes der 4'OMT für (S)-6-O-Methylaudanolin. Bedingungen: 50 μM SAM, 0,8 pkat 4'OMT, pH 8,2, 30°C. Direkte Auftragung, und linearisierte Darstellung nach HANES (1932). K_m -Wert: 4,5 μM .

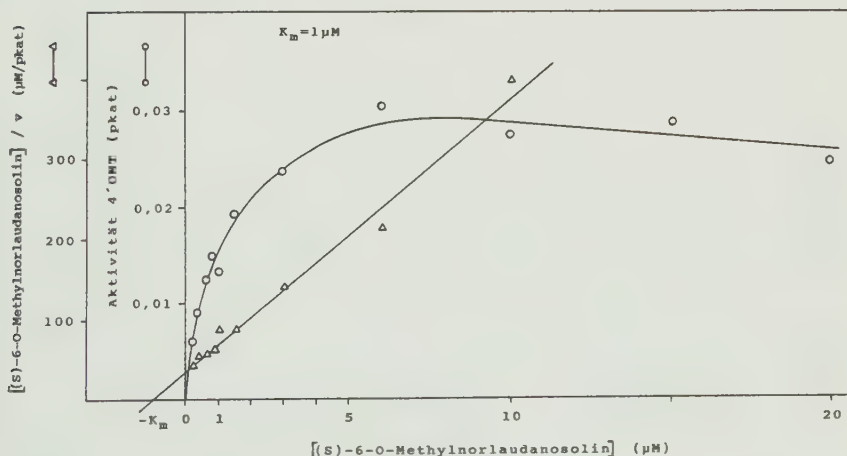
Abb. 23

dennoch den Vergleich der Werte untereinander.

Die Reaktionsbedingungen werden so gewählt, daß nicht mehr als 3-7% des eingesetzten SAM während einer Reaktion umgesetzt werden. Der Standardtest wird insoweit variiert, daß nur 7,5 nmol SAM (50 μ M) eingesetzt werden, das entspricht dem 1,7 fachen seines K_m -Wertes (s.u.).

K_m -Wert für (S)-6-O-Methylaudanosolin.

Die Bestimmung des K_m -Wertes für (S)-6-O-Methylaudanosolin erfolgt mit Standardtestansätzen in denen die Substratkonzentration zwischen 0,5 bis 30 μ M variiert wird. Die Ansätze enthalten 0,8 pkat gereinigte 4'-O-Methyltransferase (Mono Q) und werden für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Bei Auswertung der Meßwerte nach HANES (1932) ergibt sich für 6-O-Methylaudanosolin ein K_m -Wert von 4,5 μ M.



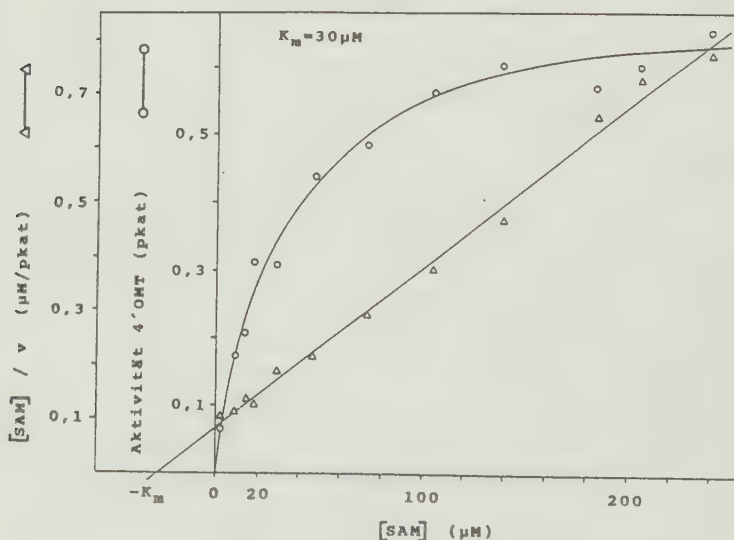
Bestimmung des K_m -Wertes der 4'OMT für (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin Bedingungen: 50 μ M SAM, 0,8 pkat 4'OMT, pH 8,2, 30°C. Direkte Auftragung, und linearisierte Darstellung nach HANES (1932). K_m -Wert: 1 μ M.

Abb. 24

K_m -Wert für (S)-6-O-Methylnorlaudanolin

Die Bestimmung des K_m -Wertes für (S)-6-O-Methylnorlaudanolin erfolgt sinngemäß. Es werden ebenfalls 0,8 pkat 4'-O-Methyltransferase (im Standardtest gegen (S)-6-O-Methyl-laudanolin ermittelt) eingesetzt. Die Substratkonzentration wird zwischen 0,2 und 20 μM variiert und die Ansätze werden für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach HANES (1932) ermittelt, ergibt sich ein K_m -Wert von 1 μM . Ab 10 μM 6-O-Methylnorlaudanolin tritt Substrathemmung auf. Eine zweite Meßreihe zwischen 2 und 100 μM Substrat verdeutlicht das. Bei 100 μM zeigt das Enzym nur noch 70% seiner maximalen Aktivität, die es bei 5-10 μM erreicht.

Der K_m -Wert von (S)-6-O-Methylnorlaudanolin ist damit um den Faktor 4-5 niedriger als der der N-methylierten Verbin-



Bestimmung des K_m -Wertes der 4'OMT für SAM. Bedingungen: 500 μM 6-O-Methyl-laudanolin, 0,6 pkat 4'OMT, pH 8,2, 30°C. Direkte Auftragung, und linearisierte Darstellung nach HANES (1932). K_m -Wert 30 μM .

Abb. 25

dung. Mit diesem Verfahren läßt sich neben dem K_m -Wert auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, also Enzymaktivität, bei Substratsättigung ermitteln. Da diese Größe aber von der eingesetzten Menge an Enzym abhängt, der Gehalt an letztlich noch aktivem Enzym in der Präparation aber nicht bekannt und bestimmbar ist, kann dieser Wert hier nicht angegeben werden.

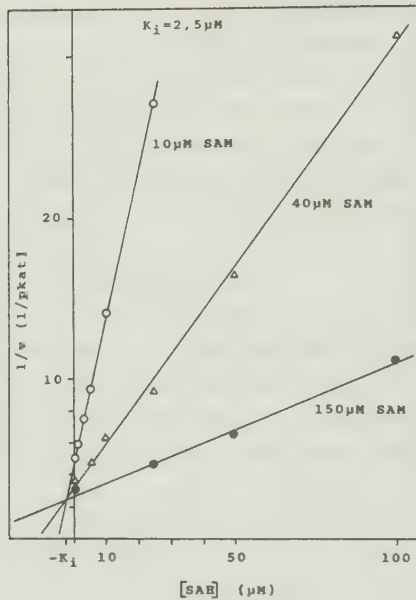
K_m -Wert für SAM

Zur Bestimmung des K_m -Wertes von SAM wird (R,S)-6-O-Methyl-*laudanosolin* als zweites Substrat verwendet. Die Forderung nach sättigenden Konzentrationen des zweiten Substrates ist hier leicht zu erfüllen, nachdem sein K_m -Wert sehr niedrig liegt. 0,5 mM (R,S)-6-O-Methyl-*laudanosolin* und 0,6 μ M 4'-O-Methyltransferase werden in die Ansätze eingesetzt, in denen die Konzentration von SAM zwischen 3 und 250 μ M variiert wird. Die Inkubation erfolgt bei 30°C für 15 Minuten. Die Auswertung nach HANES (1932) ergibt einen K_m -Wert von 30 μ M.

2.5.6 Hemmstoffe der 4'-O-Methyltransferase

Eine weitere interessante Größe bei Methylierungsreaktionen ist die Auswirkung des zweiten Reaktionsproduktes S-Adenosylhomocystein (SAH) auf die Enzymreaktion. Gegenüber vielen bislang untersuchten Methyltransferasen aus den unterschiedlichsten Stoffwechselbereichen hat es sich als sehr effizienter Inhibitor dieser Reaktionen dargestellt. Dabei tritt SAH als kompetitiver Antagonist gegenüber SAM auf (ZAPPIA et al., 1969).

Mit Standardtestansätzen (0,4 μ M 4'-O-Methyltransferase, 0,25 mM (R,S)-6-O-Methyl-*laudanosolin*, 30°C, 60 min.), die auf 200 μ l vergrößert werden, werden 3 Meßreihen mit je 10, 40 und 150 μ M SAM und steigenden Mengen an SAH von 0-25, 0-100 und 0-100 μ M durchgeführt. Die Meßwerte werden in der Darstellung nach DIXON (1953) aufgetragen. Handelt es sich bei der untersuchten Hemmung um eine kompetitive, so schneiden



Bestimmung des K_i -Wertes für SAM. Bedingungen: 167 μM (S)-6-O-Methylaudanoso-
lin, 0,4 pkat 4'OMT, pH 8,2, 30°C. Die Konzentrationen für SAM werden auf 10,
40 und 150 μM festgelegt, die Konzentration für SAH variiert. Auftragung nach
DIXON (1953). Der Schnittpunkt der Geraden gibt den K_i -Wert an: 2,5 μM .

Abb. 26

sich die Geraden für die verschiedenen Substratkonzentrationen in einem Punkt, der den K_i -Wert angibt. Für SAH ergibt sich danach ein K_i -Wert von 2,5 μM . Es ist somit auch für die 4'-O-Methyltransferase ein sehr potenter Hemmstoff.

Durch die im Rohextrakt enthaltenen Alkaloide wird offenbar ebenfalls eine starke Hemmwirkung ausgelöst, was aus der ansteigenden Enzymaktivität nach deren Abtrennung zu Beginn des Reinigungsganges gefolgert wird. Auch andere an der Biosynthese der Protoberberine beteiligte Enzyme wie die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase und Berberinbrücken-Enzym (AMANN, 1986; STEFFENS, 1984) unterliegen dieser Rück-

kopplung. Einige dieser Alkaloide und den Substraten nahestehende Verbindungen bzw. die Produkte der Reaktion werden in dieser Hinsicht untersucht. Die Messung wird mit dem üblichen Standardtest mit (S)-6-O-Methyl-*laudanosolin* als Substrat durchgeführt. Die potentiellen Hemmstoffe werden mit dem Enzym (0,2 pkat) 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von SAM und (S)-6-O-Methyl-*laudanosolin* (0,07 mM) gestartet wird. In der Tabelle 7 sind die Anteile an Restaktivität gegenüber dem nicht gehemmten Enzym aufgetragen.

Interessant erscheint, daß von den beiden Produkten der enzymatischen Reaktion, Reticulin und Norreticulin, die N-methylierte Verbindung offenbar ein besserer Konkurrent um die Bindungsstelle am Enzym ist, und so eine stärkere Hemmwirkung ausübt als die Norverbindung. Nicht verwunderlich

Hemmstoff	Konzentr. (mM)	% Rest- aktivität
Berberin	0,5	40
Jatrorrhizin	0,4	42
(S)-Reticulin	0,07	54
	0,17	18
	0,33	0
(S)-Norreticulin	0,17	76
	0,33	63
(R)-6-O-Methyl- laudanosolin	0,5	84
(R)-6-O-Methylnor- laudanosolin	0,5	75
(S)-6-O-Methylnor- laudanosolin	0,07	24
	0,10	0

Tabelle 7 Hemmung der 4'-O-Methyltransferase. Die Restaktivität wird im Standardtest mit 0,2 pkat 4'OMT, 0,07 mM (S)-6-O-Methyl-*laudanosolin* bei 37 °C ermittelt, und bezieht sich auf eine Kontrolle ohne Hemmstoff.

ist dagegen die starke Hemmwirkung von (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin das eine dem hier verwendeten Substrat vergleichbare Affinität zu dem Enzym besitzt, aber selbst bedeutend schlechter umgesetzt wird. Kontrollen, die nur diese Substanz ohne das Substrat 6-O-Methylaudanosolin enthalten, zeigen unter den gegebenen Bedingungen (geringe Enzymmenge) keinen meßbaren Umsatz zu Norreticulin.

Der Einfluß der (R)-Enantiomeren der Substrate auf die Enzymaktivität, auch bei einer 7,5 fach höheren Konzentration als das Substrat selbst, ist demgegenüber gering. Das deutet darauf hin, daß die Stereoselektivität der 4'OMT bereits auf der Stufe der Bindung des Substrates wirksam ist.

Viele Schwermetalle binden an freie SH-Gruppen von Proteinen, und führen so zu einer Inaktivierung, wenn davon das aktive Zentrum betroffen ist. Auf der anderen Seite ist gerade von Methyltransferasen, z.B. der tierischen Catechol-O-Methyltransferase (COWARD et al., 1973), bekannt, daß sie für ihre Aktivität Magnesium Ionen benötigen. Inwieweit Metalle die Aktivität der 4'OMT beeinflussen wird mit einem modifizierten Test gemessen, unter Ausschluß von Ascorbat

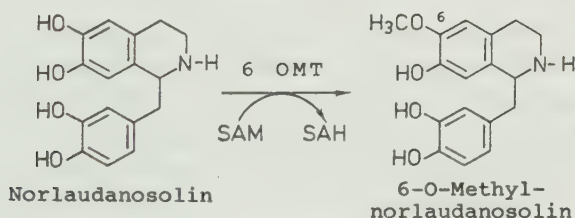
Hemmstoff	Konzentr. (mM)	% Rest- aktivität	Hemmstoff	Konzentr. (mM)	% Rest- aktivität
Mg ²⁺	5	100	EDTA	10	100
	50	60	NaN ₃	50	90
Ca ²⁺	5	100			
K ⁺	50	90	Jodosobenzoe- säure	5	26
Mn ²⁺	1	38	Jodacetamid	5	90
Fe ³⁺	1	17	N-Ethyl- maleinimid	5	8
Hg ⁺	1	16			
Zn ²⁺	1	14			
Cu ²⁺	1	7			

Tabelle 8 Hemmung der 4'-O-Methyltransferase. Die Restaktivität wird im Standardtest mit 0,4 pkat 4'OMT, 0,07 mM (S)-6-O-Methylaudanosolin bei 37 °C ermittelt, und bezieht sich auf eine Kontrolle ohne Hemmstoff.

und mit Tris Puffer pH 7,8. Das Enzym (0,4 pkat/Test) wurde zuvor gegen 20 mM Tris pH 7,8 ohne Mercaptoethanol dialysiert, und 15 Minuten bei 37 °C mit dem Hemmstoff vorinkubiert, bevor der Test (37°C) durch Zugabe der Substrate gestartet wird.

Der Chelatbildner EDTA hemmt die 4'-OMT ebensowenig wie die anderen, an der Reticulin Biosynthese beteiligten Methyltransferasen aus Berberis (RÜFFER et al., 1983a; WAT et al., 1986). Die Hemmung durch Schwermetalle deutet ebenso wie die Hemmung durch SH-Gruppen modifizierende Agenzien Jodosobenzoesäure und N-Ethylmaleinimid auf eine essentielle SH-Gruppe des Enzyms.

2.6. SAM: Norlaudanolin 6-O-Methyltransferase (6 OMT)



Reaktion, die durch die Norlaudanolin 6-O-Methyltransferase aus Berberis koetianeana katalysiert wird.

Abb. 27

Wie in vorangegangenen Kapitel dargestellt, stellt die Abtrennung der 6-O-Methyltransferase bei der Reinigung der 4'-O-Methyltransferase ein Problem dar, das nicht gelöst werden konnte. In dem beschriebenen Reinigungsgang für die 4'-OMT wird das Proteingemisch allen gängigen Prozeduren unterworfen, bei denen nach einer Reihe unterschiedlicher Kriterien getrennt wird: Hydrophobizität, Molekulargewicht, Affinität zu einem Hemmstoff, Isoelektrischer Punkt und Ladung des Proteins. Obwohl es damit gelingt praktisch alles Fremdpro-

tein abzutrennen, treten diese beiden Aktivitäten stets gemeinsam auf. Das Verhältnis der beiden Aktivitäten zueinander verändert sich während der Reinigungsprozedur nicht bedeutsam. Das wäre ein stichhaltiges Indiz dafür, daß sich die beiden enzymatischen Aktivitäten letztlich sogar auf ein und demselben Protein befinden könnten. Bei der Ähnlichkeit der Reaktion der beiden Aktivitäten wäre es nicht undenkbar, daß beide durch ein und dasselbe Enzym mit geringer Regio-spezifität katalysiert werden. Eine Untersuchung der Eigenschaften der 6 OMT und ein Vergleich mit der 4'OMT kann hierzu nähere Aussagen machen.

Aus anderen Stoffwechselwegen ist durchaus bekannt, daß ein Protein mehrere Aktivitäten besitzt. So trägt ein "Superenzym" aus Neurospora crassa 5 verschiedene Aktivitäten des Shikimisäure-Weges zusammengefaßt in einem Protein, das allerdings ein Molekulargewicht aufweist, das der Summe der in anderen Organismen auch einzeln auftretenden Enzyme entspricht, und so wahrscheinlich durch Aneinanderketten dieser Enzyme entstanden sein mag (LAMBERT und COGGINS, 1985). Auch aus Phaseolus mungo wurden zwei nicht trennbare Enzymaktivitäten (3-Dehydrochinat-Hydrolase und Shikimat: NADP⁺ Oxidoreduktase) aus diesem Stoffwechselweg isoliert und einem einzelnen Protein oder Enzymkomplex zugeschrieben (KOSHIBA, 1978).

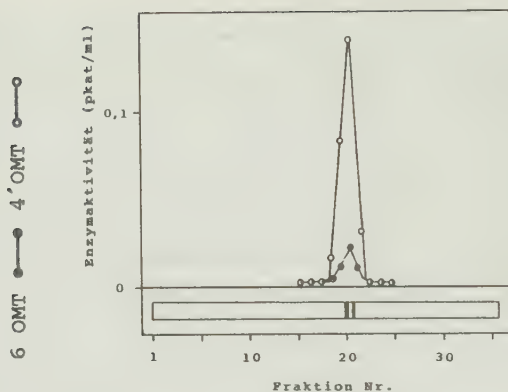
Das Auftreten zweier, etwa gleich intensiver Proteinbanden bei der SDS-Gelelektrophorese der 4'OMT-Präparation nach dem letzten Reinigungsschritt an Mono Q (s.S. 66, Abb.18) macht es jedoch eher wahrscheinlich, daß sich die beiden Aktivitäten auf zwei unterschiedlichen, aber eben außerordentlich ähnlichen Proteinen befinden.

2.6.1 Weitere Versuche zur Trennung der 6-O-Methyltransferase und der 4'-O-Methyltransferase

Nachdem sich die beiden Proteine offenbar in ihrem Molekulargewicht geringfügig unterscheiden, wird mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie ein weiterer Versuch zur Tren-

nung dieser beiden Enzyme unternommen. Bei der Bestimmung des Molekulargewichtes der 4'OMT mit dieser Säule konnte in einem Durchgang keine Trennung der beiden Aktivitäten erreicht werden, was bei dem geringen Unterschied im Molekulargewicht möglicherweise an einer zu kurzen Säule gelegen haben mag. Deshalb werden in einem entsprechend durchgeführten Versuch (s.S. 28) 200 μ l gereinigte 4'OMT/6 OMT (Mono Q) aufgegeben, die beiden aktivsten Fraktionen (je 200 μ l) mit Centricon (Amicon) eingeeengt und erneut auf die Säule gegeben. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt, so daß quasi eine Trennung an einer Säule mit der dreifachen Länge vorgenommen wird. Schon der Nachweis der Aktivität der beiden Enzyme jedesmal gemeinsam in den Peak-Fractionen deutet auf ein Mißlingen dieses Versuches. Das Eluat der dritten Säule wird mit SDS-Gelelektrophorese untersucht, und enthält danach immer noch die beiden Banden der Probe.

Eine weitere Trennmethode stellt die native Gelelektrophorese dar, bei der sowohl nach Ladung des Proteins und nach seinem Molekulargewicht getrennt wird. Durch die Überlagerung dieser beiden Trennkriterien mag sie zu anderen Ergebnissen führen, als sie deren einzelne Anwendung in verschiedenen Chromatographie-Schritten erbracht hat. Die Durchführung ist vorher beschrieben worden (s.S. 30). Bevor das Sammelgel gegossen wird, wird das Trenngel über Nacht einer Elektrophorese unterzogen, um Ammoniumpersulfat abzutrennen. Als Puffer wird dazu 0,4 M Tris pH 8,9 verwendet, also der Trenngelpuffer. Als Probe werden 300 μ l 4'OMT (Mono Q) aufgetragen. Das gefärbte Gel zeigt eine scharf getrennte Doppelbande bei R_f 0,55. Die beiden Banden liegen aber so dicht beieinander, daß es nicht gelingt, sie bei der Gelfraktionierung zu trennen. Die Aktivität der 6 OMT hat während der Prozedur zwar stark abgenommen, aber sie findet sich auch hier zusammen mit der 4'OMT in den beiden Fraktionen, die dem Bereich der Doppelbande entsprechen. Die Gelfraktion mit der höchsten Enzymaktivität wird ebenfalls mit SDS-Gelelektrophorese untersucht. Wiederum treten die



Versuch der Auftrennung der 4'OMT und 6 OMT (Mono Q-Eluat) mit nativer Disc-Elektrophorese. Ein Gel wird angefärbt, die Aktivität der Enzyme wird in einem zweiten, fraktionierten Gel bestimmt.

Abb. 28

beiden Banden der Probe auf.

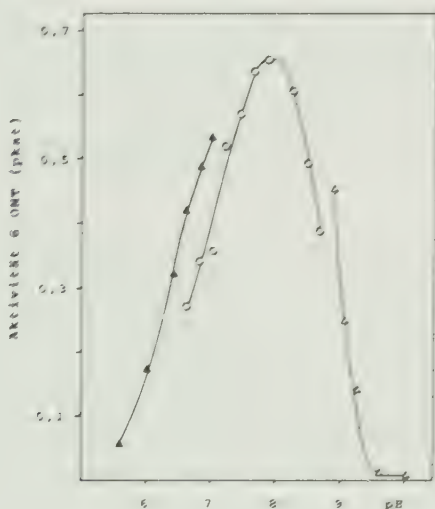
2.6.2 Eigenschaften der 6-O-Methyltransferase

2.6.2.1 Identifizierung des Reaktionsproduktes der 6 OMT

Als Substrat für die 6 OMT wird 4'-O-Methylnorlaudanosolin verwendet, um sie unabhängig von der 4' OMT nachweisen zu können. Wie bei der 4'OMT beschrieben (s.S. 67), wird ein Ansatz mit 100 nmol (R,S)-4'-O-Methylnorlaudanosolin und 160 nmol SAM mit 9 pkat 6 OMT (Mono Q) 4 Stunden bei 37°C inkubiert und mit HPLC-System C aufgetrennt. Als einziges Produkt entsteht Norreticulin (Retentionszeit 11,1 min). Norprotosinomenin (10,7), das die Methylgruppe in Stellung 7 trägt, kann nicht nachgewiesen werden, ließe sich aber unter diesen Bedingungen klar von Norreticulin trennen. Bei Co-chromatographie eines Aliquots des Ansatzes mit dem erwarteten Norreticulin entsteht ein sauberer Peak.

Mit einem zweiten Ansatz, der zusätzlich 3 μ kat N-Methyltransferase enthält, wird ebenso verfahren. Bei der HPLC entsteht ein zusätzlicher Peak bei Reticulin.

Die Peaks der Produkte bei der HPLC werden gesammelt, mit NH_3 und CHCl_3 extrahiert und wie vorher beschrieben (s.S. 68) massenspektrometrisch untersucht. Beide Substanzen entsprechen den Fragmentierungsmustern der Referenzsubstanzen. Die Methylierung erfolgt eindeutig im Isochinolin Teil des Moleküls.



Bestimmung der pH-Abhängigkeit der 6-O-Methyltransferase. Verwendete Puffer (67 mM):

▲—▲ Citrat / NaOH, ○—○ Hepes / NaOH, △—△ Glycin / NaOH.

Die Aktivität wird mit 0,7 μ kat Enzym im Standardtest ermittelt.

Abb. 29

2.6.2.2 pH-Optimum

Die Messungen zur Bestimmung des pH-Optimums der 6 OMT werden wie bei der 4'OMT beschrieben durchgeführt (s.S. 72). Es wird 4'-O-Methylnorlaudanosolin als Substrat und 0,7 pkat 6 OMT aus dem Mono Q-Reinigungsschritt eingesetzt. Die Ansätze werden 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Die maximale Enzymaktivität wird bei pH 7,8 gemessen, also bei niedrigerem pH als mit der 4'OMT.

2.6.2.3 Substratspezifität der 6-O-Methyltransferase

Auch hier wird analog zu den Untersuchungen mit der 4'OMT verfahren (s.S. 77). Die Aktivität gegenüber den verschiedenen Substraten wird im Standardtest (167 µM) mit 1,5 pkat 6-O-Methyltransferase bei 30°C ermittelt. Die entstandenen Produkte werden weiter mit HPLC untersucht und identifiziert.

Das beste Substrat für die 6 OMT ist Norcoclaurin, wobei es keinen Unterschied zwischen den Stereoisomeren gibt. Auch Norcoclaurin wird, wie Coclaurin, nicht in der 4'-Stellung methyliert, es entsteht ausschließlich Coclaurin. Wie auch die 4'OMT katalysiert die 6 OMT regiospezifisch, in dem Fall die Methylierung der 6-Stellung. Eine Methylierung in der Position 7, also die Bildung von Isococlaurin, kann in keinem Fall beobachtet werden. Bei (S)-Norlaudanosolin ist der Anteil des Umsatzes, der den beiden Enzymen zufällt, nicht zu beurteilen, da die beiden möglichen Produkte mit dem HPLC-System C nicht trennbar sind. In jedem Fall treten auch hier keine Methylierungen in Stellung 7 oder 3' auf. Die Stereoselektivität der 6 OMT ergibt kein klares Bild. Werden von Norcoclaurin beide Enantiomere etwa gleich gut umgesetzt, so wird von 4'-O-Methylnorlaudanosolin das (R)-Enantiomere etwa 8 fach besser umgesetzt.

In deutlichem Gegensatz zur 4'OMT wird von der 6 OMT das N-methylierte Substrat - in diesem Fall 4'-O-Methylaudanosolin und Laudanosolin (s.S. 79) - überhaupt nicht umgesetzt.

Substrat	relative Aktivität	N	7	3'	4'	Produkt
(R)-Norcocclaurin	100	H	OH	H	OH	(R)-Cocclaurin
(S)-Norcocclaurin	100	H	OH	H	OH	(S)-Cocclaurin
(R)-4'-O-Methylnorlaudanosolin	74	H	OH	OH	OMe	(R)-Norreticulin
(S)-4'-O-Methylnorlaudanosolin	9	H	OH	OH	OMe	(S)-Norreticulin
(R)- und (S)-4'-O-Methyl- laudanosolin	0	Me	OH	OH	OMe	-
(R)-Norlaudanosolin	46	H	OH	OH	OH	1)
(S)-Norlaudanosolin	100	H	OH	OH	OH	1) 2)
(R,S)-Laudanosolin	0	Me	OH	OH	OH	-

1) Es entsteht ausschließlich 6-O-Methylnorlaudanosolin und/oder 4'-O-Methylnorlaudanosolin. Die beiden Substanzen sind mit dem verwendeten HPLC-System C nicht zu trennen.

2) Es entsteht zusätzlich Norreticulin.

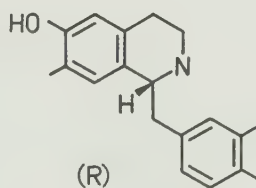
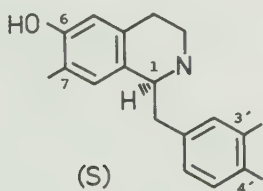


Tabelle 9

Zusammenstellung der Substanzen, die als Substrate der 6-O-Methyltransferase getestet worden sind. Angegeben sind die im Standardtest mit 1,5 pkat 6 OMT, 167 μ M Substrat bei 30°C ermittelten relativen Aktivitäten, bezogen auf (S)-Norcocclaurin.

Wie die Beispiele von Isoorientalin und 7-O-Methylnorlaudan-
anosolin (s.S. 78) zeigen, die beide nicht umgesetzt werden,
benötigt auch die 6 OMT die benachbarten freien OH-Gruppen
um reagieren zu können.

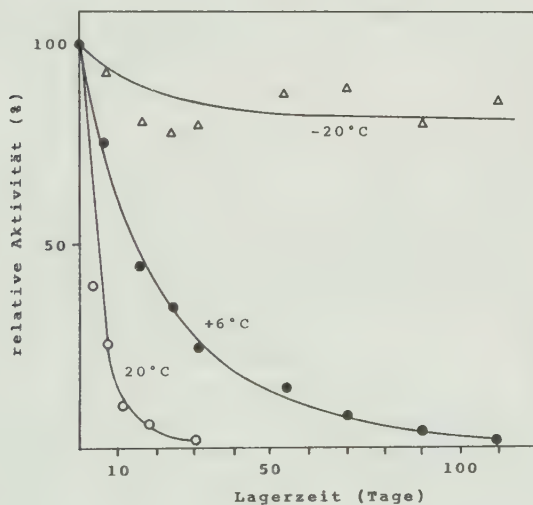
Ob es sich bei der 6 OMT um das von RÜFFER et al. (1983a)
beschriebene Enzym aus Argemone platyceras handelt, ist
nicht sicher. Zwar stimmen Molekulargewicht und pH-Optimum
in etwa überein, aber bei den umgesetzten Substraten treten
doch einige Unterschiede auf. Die Reinheit der dort be-
schriebenen 6 OMT ist nicht näher angegeben, und damit ist
auch die An- oder Abwesenheit der 4'OMT nicht geklärt. Aus
Norlaudan- und 7-O-Methylnorlaudan- entstehen in einem Verhältnis von 4:1 6-O-
Methylnorlaudan- und 7-O-Methylnorlaudan-, aber
kein 4'-O-Methylnorlaudan-. Das im Gegensatz zu Norlau-
dan- bessere Substrat der 4'OMT, das N-methylierte 6-O-
Methyl- und 7-O-Methylnorlaudan- wurde jedoch nicht eingesetzt. Das von
RÜFFER et al. (1983a) beschriebene Enzym katalysiert außer-
dem die Methylierung von 2,3-Dihydroxy-9,10-Dimethoxyproto-
berberin und dessen Tetrahydro-Derivat, wobei interessanter-
weise nur die 3-Stellung methyliert wird ((Tetrahydro)jat-
rorrhizin entsteht), die der Stellung 7 der Benzylisochino-
line entspricht. Eine Aktivität gegen 2,3,9,10-Tetrahydroxy-
tetrahydroprotoberberin kann mit der hier beschriebenen
6 OMT aus Berberis koetianeana nicht beobachtet werden
(s.S. 78). Der offensichtliche Mangel an Regioselektivität
der von RÜFFER et al. (1983a) beschriebenen 6 OMT mag des-
halb auf Verunreinigung mit einer anderen OMT zurückzuführen
sein; genaue Aussagen sind aber nicht möglich.

2.7 Stabilität der 4'-O-Methyltransferase

Für die Arbeit mit einem Enzym ist es nicht uninteressant zu
wissen, wie sich seine katalytische Aktivität während der
Bearbeitungszeit verändert. Vor allem die thermische Denatu-
rierung führt zu einer Inaktivierung, weswegen in der Regel
bei tiefen Temperaturen gearbeitet wird. Um die Lebensdauer

des Enzyms zu ermitteln, werden Aliquots einer Präparation bei verschiedenen Temperaturen gelagert, und in Abständen auf ihre Aktivität hin untersucht. Da neben der Inaktivierung durch hohe Temperaturen auch die Zersetzung durch allgegenwärtige Proteasen eine Rolle spielt, wird eine Enzympräparation möglichst hoher Reinheit verwendet, um eine Zersetzung dieser Art, die kein Charakteristikum des Enzyms darstellt, möglichst klein zu halten.

Anteile einer 4'OMT Präparation aus dem Reinigungsschritt an Mono Q, werden bei 20°C, +6°C und -20°C gelagert. Das Enzym liegt in Standardpuffer vor und enthält als Zusatz 0,05% NaN_3 , um mikrobielles Wachstum während der Lagerzeit zu



Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Aktivität der freien, löslichen 4'-O-Methyltransferase bei verschiedenen Temperaturen.

○—○ 20°C, ●—● +6°C, ▲—▲ -20°C/20% Glycerin.

Die Halbwertszeiten betragen bei 20°C 3 Tage und bei +6°C 15 Tage. Bei -20°C, in Gegenwart von 20 % Glycerin, ist die 4'OMT stabil.

100 % entsprechen 320 $\mu\text{kat}/\text{mg}$ 4'OMT.

Abb. 30

verhindern. Der Teil, der bei -20°C gelagert wird, enthält zusätzlich 20% Endkonzentration Glycerin, um das Wachstum großer Eiskristalle zu verhindern. Die dabei auftretenden hohen Scherkräfte können zur Zerstörung der gelösten Proteine führen.

Bei Raumtemperatur nimmt die Aktivität rapide ab. Die Halbwertszeit liegt etwa bei 3 Tagen. Bei $+6^{\circ}\text{C}$ beträgt sie schon etwa 15 Tage, und im eingefrorenen Zustand liegt nach einem Jahr noch 90-95% der Ausgangsaktivität vor, wobei zu erwähnen ist, daß das Enzym in dieser Zeit wiederholt aufgetaut und wieder eingefroren worden ist, ohne daß sich dies negativ ausgewirkt hätte. Der Verlauf der Aktivität der 6 OMT ist nicht mitverfolgt worden, aber ihre Aktivität ist bereits nach 3 Monaten bei -20°C nicht mehr nachweisbar. Dies sollte ein wichtiger Hinweis darauf sein, daß die Aktivitäten der 4'OMT und 6 OMT auf zwei verschiedenen Proteinen lokalisiert sind.

Auch mit der 4'OMT soll versucht werden, die geringe Stabilität der katalytischen Aktivität bei höheren Temperaturen durch Bindung an CPG-10-Glas (s.S. 32) zu verbessern. Dazu werden 240 μg Enzym (Mono Q) mit 240 pkat 4'OMT (Aktivität bei 20°C ermittelt) an 300 mg Glutardialdehyd-derivatisiertes Glas gebunden. Das geschieht mit einer 92 %igen Ausbeute bezogen auf das Protein, aber nur zu etwa 10 % bezogen auf die Aktivität der 4'O-Methyltransferase. In der gleichen Weise wie mit dem gelösten Enzym, wird die Haltbarkeit der katalytischen Aktivität dieser Präparation geprüft. Dabei kann kein Unterschied zu dem freien Enzym festgestellt werden. Die Halbwertszeiten bei den verschiedenen Lagertemperaturen entsprechen sich genau. Die Immobilisierung an CPG-10 Glas stellt also keinen Weg zur Haltbarmachung des Enzyms bei Raumtemperatur dar.

3. SAM: Norreticulín N-Methyltransferasen (NMT) aus Zellkulturen von Berberis koetineana

Als letzter der drei Methylierungsschritte in der Biosynthese des Reticulins, soll hier die Übertragung der Methylgruppe von SAM auf den Stickstoff der Benzylisochinoline untersucht werden. Vor allem eine genaue Beschreibung der Substratspezifität der an dieser Reaktion beteiligten Enzyme soll weitere Hinweise auf eine festgelegte Reihenfolge im Ablauf der Methylierungsschritte zum Reticulin hin liefern. Daß es sich bei der N-Methyltransferase nicht um ein einzelnes Enzym handelt, ist nach den Beobachtungen bei der chromatographischen Reinigung der 4'-O-Methyltransferase aus B. koetineana (s.S. 57) wahrscheinlich geworden, bei der eine Verteilung der NMT-Aktivität in mehrere Bereiche des DEAE-Eluates aufgetreten war. Eine nähere Untersuchung dieser heterogenen Enzymformen der N-Methyltransferase soll zeigen, inwieweit diese sich in ihren katalytischen Aktivitäten unterscheiden.

Ein weiterer Grund für die Bearbeitung dieser an sich bekannten Enzymaktivität (s.u.) liegt in der Absicht, diese Enzyme für die Herstellung von radioaktiv markiertem Reticulin zu nutzen, das als Tracer in weiteren Biosynthese Untersuchungen verwendet werden kann.

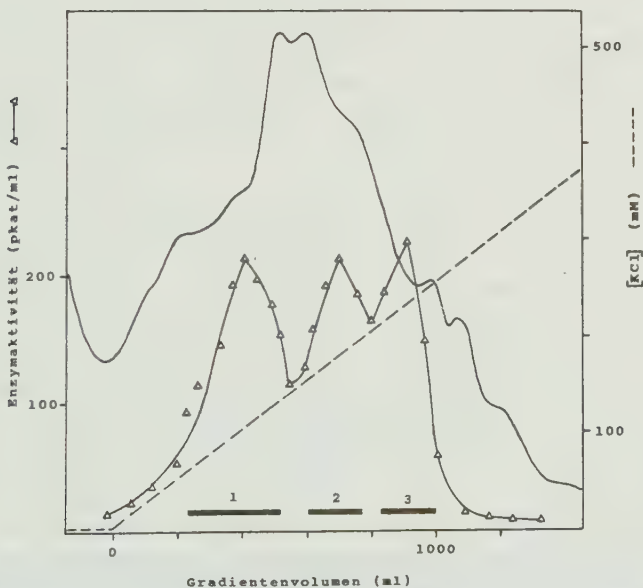
Eine Norreticulín N-Methyltransferase (NMT) aus Berberis vulgaris Zellkulturen ist bereits von WAT et al. (1986) untersucht und näher beschrieben worden. Dieses Enzym katalysiert ausschließlich die Übertragung der Methylgruppe auf den Stickstoff des Benzylisochinolingerüsts und wurde etwa 100-fach angereichert. Dieselben Autoren berichten ebenfalls von dem Vorkommen einer weiteren N-methylierenden Aktivität in dem von ihnen untersuchten Gewebe, geben jedoch keine weiteren Daten darüber an.

schen Schritten an DEAE-Sephacel, Phenyl-Superose und Mono Q, in denen 20 mM Phosphat pH 7,5 mit 20 mM Mercaptoethanol als Standardpuffer verwendet wird. Die Säuleneluate werden mit (R,S)-Norreticulin als Substrat mit dem Standardtest auf NMT-Aktivität hin durchgetestet.

Eine schematische Darstellung des Trennungsgangs ist in Abb. 35 wiedergegeben.

3.1.1 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel

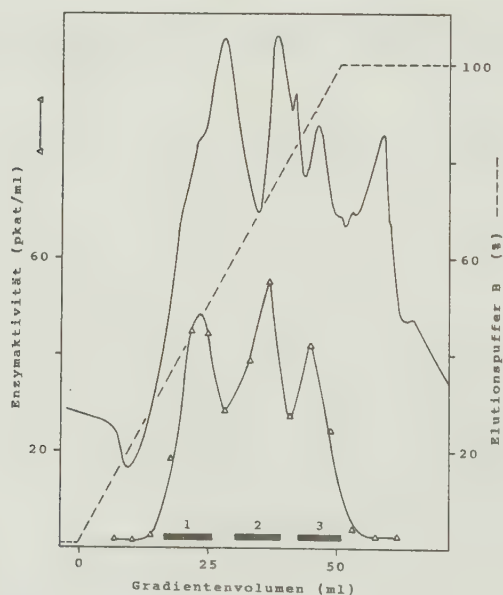
Als erster Reinigungsschritt erfolgt eine Auftrennung des Rohextraktes an DEAE-Sephacel. Wie bei der Reinigung der



Elutionsprofil der DEAE-Sephacel Säule (5 cm Ø x 20 cm). Flußrate 4 ml/min. Der Startpuffer ist Standardpuffer, der Elutionspuffer enthält 1 M KCl in Standardpuffer. Steigung des Gradienten 25 mM / 100 ml. Die durch Balken gekennzeichneten Bereiche werden für die weitere Reinigung zusammengefaßt (DEAE-Fractionen 1-3). Die Enzymaktivität wird im Standardtest ermittelt.

Abb. 32

4'OMT dargestellt (s.S. 57), wird der Rohextrakt zur Abtrennung der enthaltenen Alkaloide vor der Aufgabe auf die DEAE Säule über eine XAD-Säule gepumpt. Die Elution der DEAE Säule erfolgt mit einem linearen Gradienten von 0-400 mM KCl in einem Volumen von 1600 ml und mit einer Flußrate von 4 ml/min. Drei Fraktionen, die bei (1) 110 mM, (2) 180 mM und (3) 230 mM KCl von der Säule eluieren, werden getrennt gesammelt und weiter bearbeitet.



Trennung der DEAE-Fraktion 2 an Phenyl-Superose (1 cm $\varnothing$ x 10 cm). Flußrate 0,5 ml/min. Der Startpuffer enthält 15% Sättigung Ammoniumsulfat in Standardpuffer, der Elutionspuffer B enthält 30% Ethylenglycol in Standardpuffer. Die durch Balken gekennzeichneten Bereiche werden für die weitere Reinigung zusammengefaßt (Phenyl-Superose Fraktionen 1-3). Die Enzymaktivität wird im Standardtest ermittelt.

Abb. 33

3.1.2 Hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Superose

Die Fraktionen 1-3 der DEAE Säule werden auf 15% Sättigung Ammoniumsulfat eingestellt, abzentrifugiert und durch eine 0,8 μ m Membran partikelfrei filtriert. Sie werden dann auf die mit Standardpuffer mit 15% Ammoniumsulfat äquilibrierte Phenyl-Superose Säule (1 cm $\varnothing$ x 10 cm; 8 ml Gelbett) aufgepumpt. Um eine gute Trennung zu erreichen, werden nicht mehr als 70 mg Protein in einem Lauf aufgetragen, so daß für jede DEAE-Fraktion mehrere Läufe notwendig sind. Eluiert wird mit 30% Ethylenglycol in Standardpuffer (Puffer B) in einem Volumen von 50 ml und einer Flußrate von 0,5 ml/min.

DEAE-Fraktion-1: Die NMT-Aktivität dieser Fraktion eluiert von der Phenyl-Superose Säule bei etwa 45 % B. Andere NMT-Aktivitäten werden nicht detektiert.

DEAE-Fraktion-2: (s.Abb. 33) Der mittlere Aktivitätspeak des DEAE Eluates enthält offenbar noch die beiden benachbarten NMT-Aktivitäten, und wird durch diese Chromatographie wiederum in drei Bereiche aufgetrennt. Die NMT-Aktivitäten, die in den Bereichen bei 45 % B, 70 % B und bei 90 % B eluieren, werden in den getrennten Fraktionen 1, 2 und 3 gesammelt.

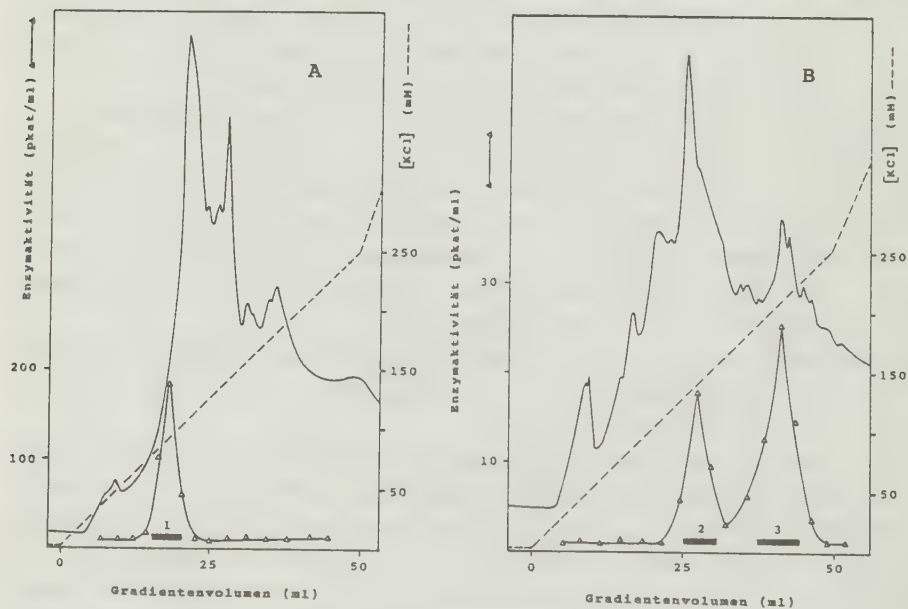
DEAE-Fraktion-3: Die NMT-Aktivitäten dieser Fraktion werden in zwei Bereiche aufgetrennt, die bei 70 % B und bei 90 % B liegen.

Die NMT-Aktivitäten, die in den verschiedenen Läufen bei derselben Konzentration des Elutionspuffers B von der Säule abgelöst werden, werden in den Fraktionen 1-3 vereinigt und gegen Standardpuffer dialysiert (3 x 1 l; je 2 Stunden).

Die auf diese Weise getrennten drei N-Methyltransferasen überlagern sich in ihrer Aktivitätsverteilung auf den Chromatogrammen der Phenyl-Superose immer noch recht deutlich und werden weiter an dem Ionenaustauscher Mono Q getrennt.

3.1.3 Ionenaustauschchromatographie an Mono Q

Die drei nach ihrem Elutionsbereich zusammengefaßten und dialysierten Fraktionen der Phenyl-Superoose werden auf eine mit Standardpuffer äquilibrierte Mono Q Säule gepumpt, und mit einem linearen Gradienten von 0 auf 250 mM KCl in einem Volumen von 50 ml (5 mM/ml) und 1 ml/min eluiert. Es werden nicht mehr als 5 mg Protein in einem Lauf aufgetragen, und auch hier sind deshalb mehrere Läufe für jede Probe notwendig.



Trennung der Phenyl-Superoose Fraktion 1 (A) und Fraktion 3 an der Mono Q Säule (0,5cm $\varnothing$ x 5cm). Flußrate 1 ml/min. Startpuffer ist Standardpuffer, der Elutionspuffer enthält 0,5 M KCl in Standardpuffer. Steigung des Gradienten 5 mM/ml. Die durch Balken gekennzeichneten Bereiche werden zusammengefaßt. Die Enzymaktivität wird im Standardtest ermittelt.

Abb. 34

Phenyl-Superose-Fraktion-1: (s.Abb. 34a) Es kommt zu keiner weiteren Auftrennung der NMT-Aktivität. Sie eluiert bei 90 mM KCl und wird als NMT-I bezeichnet.

Die beiden anderen NMT-Aktivitäten sind nach der Phenyl-Superose noch nicht endgültig auseinander getrennt, und ergeben bei dieser Chromatographie erneut jeweils zwei Aktivitätspeaks.

Phenyl-Superose-Fraktion-2: Die NMT-Aktivitäten eluieren bei 140 mM und 200 mM KCl von der Säule. Beide Aktivitäten sind etwa gleich intensiv.

Phenyl-Superose-Fraktion-3: (s.Abb. 34b) Die NMT-Aktivitäten dieser Fraktion eluieren ebenfalls bei 140 mM und 200 mM KCl von der Säule.

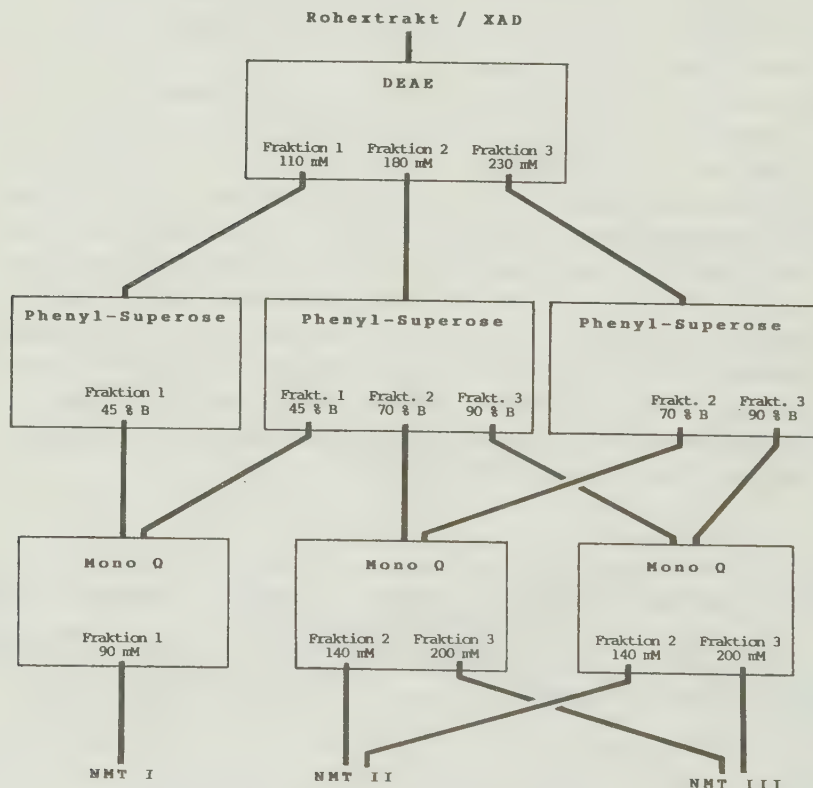
Die übereinstimmenden Bereiche dieser beiden Läufe werden jeweils zusammengefaßt und als NMT-II (140 mM KCl) und NMT-III (200 mM KCl) bezeichnet. Die Rechromatographie von NMT-I, -II und -III an Mono Q und Phenyl-Superose zeigt, daß die so gewonnenen Präparationen frei sind von den jeweils anderen beiden NMT-Aktivitäten. Durch diese Rechromatographie wird auch sichergestellt, daß die multiplen Formen der N-Methyltransferase nicht als Artefakte unter den Bedingungen der Säulenchromatographie entstehen.

	Volumen (ml)	Gesamt- Protein (mg)	Spezif. Aktivität (μ kat/mg)	Gesamt- Aktivität (nkat)	Ausbeute (%)	Reinigung (-fach)
Rohextrakt- XAD	1500	3950	23	91	100	1
Mono Q						
NMT-I	43	6,8	650	4,4	5	28
NMT-II	54	1,9	420	0,8	1	18
NMT-III	47	2,6	425	1,1	1	18

Tabelle 10 Übersicht über den Trennungsgang der N-Methyltransferasen aus 650 g FG (45 g TG), 12 Tage altem Gewebe aus Zellkulturen von B. koetineana. Die Aktivität der NMT wird mit (R,S)-Norreticulin im Standardtest ermittelt.

Die Aktivitäten der drei N-Methyltransferasen nach dem Reinigungsschritt an Mono Q und die des Rohextraktes sind in Tabelle 10 angegeben.

Bei nur geringen Ausbeuten gelingt es auf diese Weise drei Formen der N-Methyltransferase auseinander zu trennen, die sich in ihrem chromatographischen Verhalten unterscheiden.



Schematische Darstellung des Trennungsganges der N-Methyltransferasen aus *B. koetaneana*. Bei DEAE und Mono Q sind die KCl-Konzentrationen, bei Phenyl-Superoxose der Anteil Elutionspuffer B (30 % Ethylenglycol in Standardpuffer) angegeben, bei dem die Fraktion von der Säule eluiert.

Abb. 35

3.2 Eigenschaften der heterogenen Formen der N-Methyltransferase: NMT-I, NMT-II und NMT-III

3.2.1 Identifizierung des Reaktionsproduktes der N-Methyltransferasen

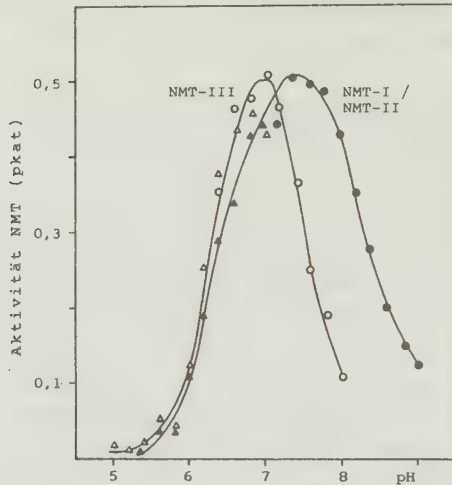
Da in der Trennungszurordnung Norreticulin als Testsubstrat verwendet worden war muß geklärt werden, ob es sich bei den drei Enzymformen um N-Methyltransferasen handelt, die keine O-methylierende Aktivität gegen das verwendete Substrat besitzen. Der DC-Nachweis der Reaktionsprodukte erfolgt wie bei der 4'OMT beschrieben (s.S. 67). 50 nmol (R,S)-Norreticulin werden mit 30.000 cpm, 10 nmol ^{14}C -SAM und 1-3 pkat der drei NMT in den üblichen Testansätzen für 2 Stunden inkubiert. Die Ethylacetat-Extrakte werden mit DC in Laufmittel 3 aufgetrennt. In allen drei Fällen liegt der Radioaktivitätsspeak genau auf der Referenz von Reticulin. Andere Produkte können trotz der guten Trennleistung dieses Laufmittels nicht detektiert werden.

Für Norreticulin und Coclaurin werden Ansätze mit 100 nmol Substrat und 160 nmol SAM mit 4 pkat der drei NMT für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Diese Ansätze werden mit HPLC-System C untersucht. Es entsteht jeweils nur ein neuer Peak bei den für Reticulin (12,1 min) bzw. N-Methylcoclaurin (10,6 min) typischen Retentionszeiten.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die isolierten NMT die Übertragung der Methylgruppe nur auf den Stickstoff der Benzylisochinoline katalysieren.

3.2.2 pH- und Temperatur Optimum der N-Methyltransferasen

Das pH-Optimum wird mit 0,5 pkat NMT-I, -II und -III im Standardtest mit (R,S)-Norreticulin als Substrat und Puffern in 0,2 pH-Abstufungen in dem Bereich von pH 5-9 bestimmt.



Bestimmung der pH-Abhängigkeit der N-Methyltransferasen. Verwendete Puffer (67 mM):

▲—▲—▲ Citrat / NaOH, ○—○ Phosphat, ●—● Tris / HCl.

Die Aktivität wird im Standardtest mit je 0,5 pkat NMT-I, -II und -III ermittelt. Die Kurven von NMT-I und -II fallen zusammen.

Abb. 36

Die Ansätze werden 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Bei den folgenden pH-Werten, ist die jeweils höchste Enzymaktivität gemessen worden:

	NMT-I	NMT-II	NMT-III
pH-Optimum	7,4	7,4	6,8

Das temperaturabhängige Maximum der Enzymaktivitäten der NMT wird im Standardtest mit (R,S)-Norreticulín im jeweiligen pH-Optimum der NMT bestimmt. Von NMT-I werden 1 pkat, von NMT-II 0,5 pkat und von NMT-III 0,7 pkat in die Ansätze eingesetzt, die verteilt über einem Temperaturbereich von 0–80°C für 7 Minuten (30–80°C) bzw. 20 Minuten (0–25°C) inkubiert werden. Das Temperatur-Optimum der drei NMT liegt in dem Bereich von 35–40°C.

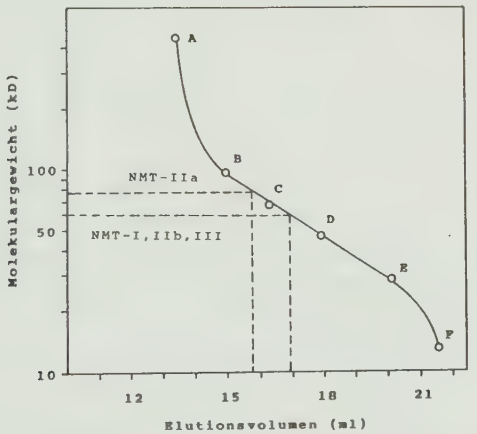
3.2.3 Molekulargewicht der N-Methyltransferasen

Die Bestimmung der Molekulargewichte der verschiedenen N-Methyltransferase-Enzyme erfolgt mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie und anschließender Aktivitätsbestimmung in dem fraktionierten Eluat (s.S. 28).

Je 5 ml der drei N-Methyltransferasen (nach dem Mono Q-Reinigungsschritt) werden an einer YM 30 Membran (Amicon) mit Druckfiltration auf 400-500 μ l eingengt, wovon 200 μ l analysiert werden.

Die NMT-I und NMT-III eluieren nach einem Retentionsvolumen von 16,9 ml. Verglichen mit Eichproteinen, entspricht das einem Molekulargewicht von 60 kD.

In der NMT-II-Präparation befinden sich zwei N-Methyltransferasen mit unterschiedlichen Molekulargewichten, die sich mit diesem Verfahren trennen lassen. Das schwere Enzym



Bestimmung des Molekulargewichtes der N-Methyltransferase mit Gelpermeations-HPLC (s.S. 28). Als Vergleich dienen Ferritin (450 kD) (A), Phosphorylase b (97 kD) (B), Rinderserumalbumin (68 kD) (C), Hühnerei Albumin (45 kD) (D), Carboanhydrase (29 kD) (E), Cytochrom C (12 kD) (F). Elutionsvolumen der NMT-I, -IIb und NMT-III: 16,9 ml; Molekulargewicht 60 kD. Elutionsvolumen der NMT-IIa: 15,8 ml; Molekulargewicht 78 kD.

Abb. 37

tritt bereits nach 15,8 ml aus der Säule aus, und weist damit ein Molekulargewicht von etwa 78 kD auf (NMT-IIa). Das leichtere eluiert nach 16,8 ml und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 60 kD (NMT-IIb).

Die Heterogenität der N-Methyltransferase erstreckt sich also auch auf das Molekulargewicht der verschiedenen Enzymformen. Drei N-Methyltransferase-Enzyme unterscheiden sich im Molekulargewicht nicht, haben aber mit 60 kD alle ein etwas geringeres Molekulargewicht als die von WAT et al. (1986) beschriebene N-Methyltransferase mit 68 kD. Ein N-Methyltransferase-Enzym (NMT-IIa) besitzt mit 78 kD ein deutlich höheres Molekulargewicht. Die schwere N-Methyltransferase-IIa wird zusammen mit NMT-IIb weiter untersucht.

3.2.4 Substratspezifität der N-Methyltransferasen

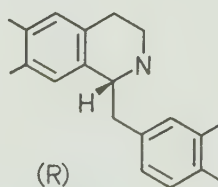
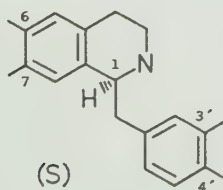
Für die Festlegung einer Reihenfolge bei den Methylierungsschritten zum Reticulin kommt der Substratspezifität der beteiligten Enzyme und ihrer Aktivität gegen diese Substrate große Bedeutung zu. Mit einer Reihe von entsprechend O-methylierten Substraten soll der Einfluß des Methylierungsmusters auf die Aktivität der drei Formen der N-Methyltransferase untersucht werden.

Im Standardtest werden jeweils 30 nmol (200 µM) des Substrates und 1 pkat NMT-I, 0,4 pkat NMT-II und 0,8 pkat NMT-III eingesetzt. Inkubiert wird bei 30°C. In Tabelle 11 sind die relativen Aktivitäten in Bezug auf das jeweils beste Substrat des Enzyms angegeben.

Die Daten der Tabelle 11 lassen folgende Feststellungen zu. Der Mangel an Reaktivität gegen 6-O-Methylaudanosolin,

Tabelle 11	Zusammenstellung der Benzylisochinolin Alkaloide, die als Substrate der drei N-Methyltransferase-Enzyme aus <u>B. koetaneana</u> getestet worden sind. Angegeben sind die im Standardtest mit 1 pkat NMT-I, 0,4 pkat NMT-II bzw. 0,8 pkat NMT-III und 200 µM Substrat bei 30°C ermittelten, relativen Aktivitäten, bezogen auf (R)-Tetrahydropapaverin (NMT-I) bzw. (R)-Cocclaurin (NMT-II und -III).
------------	---

Substrat	relative Aktivität (%)			Stellung der Methylgruppen				
	NMT-I	NMT-II	NMT-III	N	6	7	3'	4'
(R)-Norcocclaurin	28	31	4	H	OH	OH	H	OH
(S)-Norcocclaurin	14	31	24	H	OH	OH	H	OH
(R)-Cocclaurin	56	100	100	H	OMe	OH	H	OH
(S)-Cocclaurin	75	91	62	H	OMe	OH	H	OH
(R,S)-Isococclaurin	34	---	5	H	OH	OMe	H	OH
(R,S)-Norarnepavin	49	---	73	H	OMe	OMe	H	OH
(R)-Norlaudanolin	0	0	0	H	OH	OH	OH	OH
(S)-Norlaudanolin	0	0	0	H	OH	OH	OH	OH
(R,S)-Laudanolin	0	0	0	Me	OH	OH	OH	OH
(R)-6-O-Methylaudanolin	0	0	0	Me	OMe	OH	OH	OH
(S)-6-O-Methylaudanolin	0	0	0	Me	OMe	OH	OH	OH
(R)-6-O-Methyl-norlaudanolin	67	72	37	H	OMe	OH	OH	OH
(S)-6-O-Methyl-norlaudanolin	44	49	30	H	OMe	OH	OH	OH
(R,S)-7-O-Methyl-norlaudanolin	12	0	0	H	OH	OMe	OH	OH
(R,S)-4'-O-Methyl-norlaudanolin	3	0	0	H	OH	OH	OH	OMe
(R)-Norreticulín	70	76	63	H	OMe	OH	OH	OMe
(S)-Norreticulín	65	71	72	H	OMe	OH	OH	OMe
(R)-Norprotosinomenin	6	0	0	H	OH	OMe	OH	OMe
(R,S)-Nororientalin	77	65	55	H	OMe	OH	OMe	OH
(R,S)-Norisoorientalin	7	---	0	H	OH	OMe	OMe	OH
(R,S)-Noroodamin	78	---	---	H	OMe	OH	OMe	OMe
(R)-Tetrahydropapaverin	100	83	13	H	OMe	OMe	OMe	OMe
(S)-Tetrahydropapaverin	54	45	12	H	OMe	OMe	OMe	OMe



4'-O-Methylnorlaudanosolin und Norlaudanosolin beweist die Abwesenheit von O-Methyltransferasen in den NMT-Präparationen. Ohne daß die Reaktionsprodukte der anderen Umsetzungen analysiert worden sind, kann deshalb mit einer gewissen Sicherheit davon ausgegangen werden, daß es sich jeweils um N-Methylierungen handelt.

Außerdem wird damit auch eine, schon von WAT et al. (1986) beobachtete, Abhängigkeit der NMT-Aktivität von einer vorhandenen O-Methylierung in Position 6 bestätigt; mit der Ausnahme Norcocclaurin, gegen das bis zu 30 % relative Aktivität gemessen wird. O-Methylierungen in den anderen Positionen bewirken keine gesteigerten Umsatz durch die NMT. Auch hier mit einer Einschränkung, daß nämlich NMT-I vor allem Isococclaurin (30% relative Aktivität), aber in geringem Umfang auch alle anderen 7-Methoxyverbindungen, durchaus umzusetzen vermag.

Aus den Umsetzungen mit den verschiedenen Substraten wird gefolgert, daß als Voraussetzung für die Methylierung am Stickstoff durch die N-Methyltransferase in der Regel die 6-Methoxygruppe vorhanden sein muß. Die Methylierungen in den anderen Positionen haben keinen bedeutenden Einfluß darauf, ob die Substanz als Substrat der N-Methyltransferase akzeptiert wird.

Ein gewisser Unterschied zwischen den drei Formen der N-Methyltransferase zeigt sich in ihrer Aktivität gegenüber den getesteten Substraten. Bei dieser Betrachtung muß berücksichtigt werden, daß die in Tabelle 11 angegebenen relativen Aktivitäten nur einen Vergleich der Substrate einer NMT untereinander zulassen (=Spalten), nicht aber den Vergleich der Aktivitäten der verschiedenen Enzyme gegenüber einem Substrat (=Zeilen). Dies ist deshalb nicht möglich, da ein solcher Vergleich nur auf der Basis der spezifischen Aktivitäten der einzelnen Enzyme sinnvoll ist. Die spezifischen Aktivitäten können aber nicht angegeben werden, da die Enzyme nicht homogen vorliegen und ihr Anteil am Gesamtprotein der jeweiligen Präparation nicht ermittelt werden kann. Dennoch ist eine Aussage zu dem jeweils am effektivsten

umgesetzten Substrat möglich. Während für NMT-I (R)-Tetrahydropapaverin das beste Substrat darstellt ist es für NMT-III (R)-Cocclaurin. (R)- und (S)-Tetrahydropapaverin werden von diesem Enzym kaum umgesetzt. Für NMT-II ist ebenfalls (R)-Cocclaurin das beste Substrat, Tetrahydropapavrin wird aber fast ebenso gut umgesetzt.

Alle drei N-Methyltransferasen zeigen keine ausgeprägte Stereoselektivität. Während NMT-II immer die (R)-konfigurierten Substrate geringfügig besser umsetzt wechselt das bei den anderen beiden N-Methyltransferasen von Substrat zu Substrat.

Auch bei der Aktivität gegen die für diese Untersuchung interessanten Substrate 6-O-Methylnorlaudanolin und Norreticulin gibt es keine Unterschiede zwischen den drei N-Methyltransferasen. Von den biosynthetisch relevanten (S)-Enantiomeren wird Norreticulin 1,5 bis 2-fach effektiver umgesetzt als 6-O-Methylnorlaudanolin. Weitere Auskunft darüber, welches nun das "natürliche" Substrat der N-Methyltransferase ist, soll die Bestimmung der K_m -Werte dieser Substanzen geben.

3.2.5 Bestimmung der K_m -Werte der NMT-I, NMT-II und NMT-III von 6-O-Methylnorlaudanolin und Norreticulin

Mit denselben Einschränkungen, wie sie schon bei der 4'OMT erwähnt wurden (s.S.81), wird eine vergleichende Bestimmung der K_m -Werte von 6-O-Methylnorlaudanolin und Norreticulin gegenüber den drei N-Methyltransferasen durchgeführt. Die Inkubationsbedingungen der Testansätze sind 50 μ M SAM, 30°C und der pH-Wert im Optimum der jeweiligen NMT. Ansonsten entsprechen sie dem Standardtest. Inkubiert wird jeweils 10 Minuten, wobei nicht mehr als 5 % des eingesetzten SAM umgesetzt werden. Von NMT-I werden 0,5 μ kat, von NMT-II 0,5 μ kat und von NMT-III 0,7 μ kat eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgt nach der Methode von HANES (1932). Der Konzentrationsbereich, in dem das Substrat variiert wird, und die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Substrat	NMT-I			NMT-II			NMT-III		
	Konz.	K_m	V_{max}	Konz.	K_m	V_{max}	Konz.	K_m	V_{max}
	μM	μM	pkat/mg	μM	μM	pkat/mg	μM	μM	pkat/mg
(R)-Norreticulin	1-70	18	175	1-70	15	75	1-100	12	259
(S)-Norreticulin	1-100	17	200	1-70	9	75	1-100	5	309
(R)-6-O-Methylnorlaudanolin	1-25	5	212	0,5-40	4	72	1-100	50	132
(S)-6-O-Methylnorlaudanolin	1-30	12	100	0,5-30	3	54	0,5-50	1,5	123

Tabelle 12

Ergebnisse der K_m -Wert Bestimmungen der drei N-Methyltransferasen gegenüber den, potentiell an der Reticulinbiosynthese beteiligten Substraten. Die Reaktionsbedingungen sind 50 μM SAM, 30°C, pH-Wert im jeweiligen Optimum des Enzyms. Bei den V_{max} -Werten handelt es sich um spezifische Aktivitäten, die den Vergleich zwischen den Substraten ermöglichen sollen. Für jedes Substrat ist der Bereich angegeben, innerhalb dessen es während der Bestimmung variiert wird.

Während die K_m -Werte der NMT-I gegen (S)-Norreticulin und (S)-6-O-Methylnorlaudanolin etwa gleich sind, ist der K_m -Wert von (S)-6-O-Methylnorlaudanolin der beiden anderen Enzymformen etwa ein Drittel niedriger als der von (S)-Norreticulin. Damit steht einem niedrigeren K_m -Wert von (S)-6-O-Methylnorlaudanolin eine etwas geringere Umsatzgeschwindigkeit entgegen. Die Frage nach dem "natürlichen" Substrat der NMT kann also auch nach diesem Ansatz nicht eindeutig beantwortet werden. Entscheidend ist wohl, in welchem Ausmaß die beiden möglichen Substrate (S)-Norreticulin und (S)-6-O-Methylnorlaudanolin in der Zelle gebildet werden, und in welcher Konzentration sie vorliegen. Darüber sind aber keine Daten bekannt.

3.3 Immobilisierung der N-Methyltransferasen

3.3.1 Präparative Isolierung von NMT aus B. koetineana Zellkulturen

Beschäftigte sich das vorangegangene Kapitel mit der Trennung und näheren Beschreibung der verschiedenen, in B. koetineana vorkommenden Formen der N-Methyltransferase, so soll hier kurz eine Prozedur zur Gewinnung von NMT für Synthesezwecke beschrieben werden. Wie schon bei der SAM-Synthetase erwähnt, zielt in einem solchen Fall die Reinigung nicht auf hochangereicherte Präparationen ab, sondern auf einen möglichst guten Ertrag an Enzymaktivität und die Abtrennung von enzymatischen Aktivitäten, die die verwendeten Substrate oder die gebildeten Produkte einer solchen Synthese zersetzen. Da sich die verschiedenen NMT in ihren Reaktionsbedingungen nicht grundlegend unterscheiden, ist eine Trennung nicht notwendig.

Der Reinigungsgang umfaßt drei chromatographische Schritte an DEAE-Sephacel, Phenyl-Sepharose und TSK-Fraktogel. Als Standardpuffer wird in diesem Verfahren 20 mM Phosphat pH 7,5 mit 20 mM Mercaptoethanol verwendet. Die Durchführung

	Volumen (ml)	Gesamt-Protein (mg)	Spezif. Aktivität (pkat/mg)	Gesamt-Aktivität (nkat)	Ausbeute (%)	Reinigung (-fach)
Rohextrakt-XAD	1180	2630	27	71	100	1
DEAE-Sephacel	670	1130	52	59	83	2
Phenyl-Sepharose	160	210	240	51	72	9
TSK-Fraktogel	43	135	330	45	63	12

Tabelle 13 Übersicht über die Reinigung von N-Methyltransferase aus 480 g FG (34 g TW), 12 Tage altem Gewebe aus Zellkulturen von B. koetineana. Die Aktivität der NMT wird mit (R,S)-Norreticulin im Standardtest ermittelt.

gleichst genau den ersten drei Schritten der Reinigung der 4'OMT (s.S. 57), mit dem Unterschied, daß die Fraktionen mit NMT-Aktivität gesammelt und weiterverarbeitet werden, ohne daß dabei zwischen den verschiedenen Formen der NMT differenziert wird. Ausgangsmaterial sind 480 g Frischgewicht (34 g Trockengewicht), 12 Tage altes Gewebe. Tabelle 13 gibt einen Überblick über den Verlauf der Reinigung.

3.3.2 Immobilisierung

Für die Immobilisierung werden zunächst verschiedene Trägermaterialien im Hinblick auf eine gute Ausbeute an gebundener Aktivität untersucht. Die Verfahren zur Fixierung des Enzyms an die einzelnen Träger wurde auf S. 32 beschrieben. Je 90 pkat und 450 µg NMT (TSK) werden mit je 100 mg (Trockengewicht) entsprechend vorbehandeltem Träger versetzt. Das entspricht einem Verhältnis 4,5 mg Protein pro 1 g Träger. Die Suspensionen werden über Nacht bei +6°C mit einem Rotationsmischer bewegt. Die Überstände werden abgezogen, die restlichen aktiven Gruppen der Trägermaterialien mit Tris blockiert und nicht fest gebundenes Protein ausgewaschen (s.S. 33). Die Trägersuspension wird mit Standardpuffer auf

Träger	Protein gebunden	Aktivität
aktivierte CH-Sepharose	95 %	45 %
CNBr-Sepharose	51 %	16 %
Tresyl-Sepharose	35 %	7 %
Glutardialdehyd-derivatisierte		
AH-Sepharose	98 %	40 %
CPG-10 Glas	98 %	42 %

Tabelle 14

Immobilisierung der NMT (90 pkat, 0,5 mg) aus *B. koetineana* an verschiedene Trägermaterialien (100 mg). Der Anteil gebundener Aktivität, im Standardtest ermittelt, bezieht sich auf das freie Enzym und berücksichtigt nur den gebundenen Anteil des Proteins.

1 ml aufgefüllt. Das Ergebnis der Immobilisierung an die verschiedenen Träger ist der Tabelle 14 zu entnehmen. Die Ausbeuten an immobilisierter NMT-Aktivität sind also bedeutend besser, als sie für die 4'OMT bestimmt werden konnten.

Die Aktivität der immobilisierten NMT wird mit dem Standardtest bei Raumtemperatur (ca. 20°C) bestimmt, wozu das Enzym einer möglichst homogen aufgewirbelten Suspension entnommen wird, was vor allem bei dem rasch sedimentierenden Glas CPG-10 nicht unproblematisch ist.

Bei 20°C zeigt die N-Methyltransferase sowohl in freier, wie in immobilisierter Form nur etwa 40 % ihrer maximalen Aktivität bei 37°C. Auf der anderen Seite haben Vorversuche ergeben, daß Testansätze, die während der Inkubationsdauer ruhen, nur 40-50% des Umsatzes, der in dieser Zeit durchgemischten Ansätze, erzielen. Dieses Phänomen ist auf den besseren Austausch der Substrate und Produkte der enzymatischen Reaktion zwischen der Lösung und dem trägergebundenen Enzym in den durchgemischten Ansätzen zurückzuführen. Als Kompromiß werden daher alle Ansätze bei Raumtemperatur mit einem Rotationsmischer bewegt.

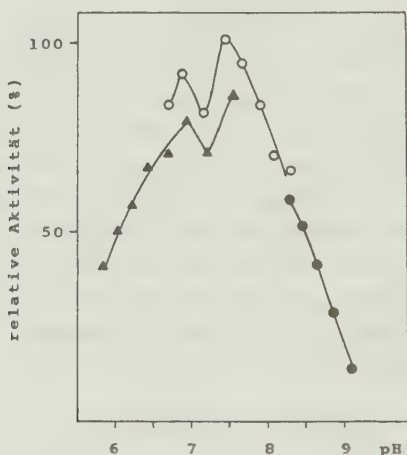
In zwei größeren Ansätzen wird N-Methyltransferase an die beiden besten Träger des Vorversuchs, an aktivierte CH-Sepharose und an CPG-10 Glas gebunden.

1,5 g vorbehandelte CH-Sepharose werden mit 1,1 nkat und 7,2 mg NMT (TSK) bei 6°C inkubiert. Mehr als 95 % des Proteins werden dabei gebunden, wobei 43 % der NMT am Träger aktiv bleiben.

5,5 g CPG-10 Glas werden mit 13,2 nkat und 145 mg NMT (TSK) (26 mg/g Glas) inkubiert. Auch hier wird praktisch das gesamte Protein gebunden. 45 % der Enzymaktivität sind nach der Immobilisierung am Träger aktiv.

3.3.3 Eigenschaften der immobilisierten N-Methyltransferasen

Mit der CPG-10 Glas Präparation wird das pH-Optimum der N-Methyltransferase in ihrer immobilisierten Form ermittelt. Jeweils 0,9 pkat glasgebundene NMT werden im Standardtest mit (R,S)-Norreticulin im Bereich von pH 5,5-9 mit 0,2 pH-Abstufungen inkubiert. Es ergibt sich ein zweigipfeliges Profil mit Maxima bei pH 6,9 und 7,5, die genau denen der verschiedenen löslichen NMT entsprechen.



Bestimmung der pH-Abhängigkeit der an CPG-10 Glas immobilisierten N-Methyltransferase. Die Aktivität wird im Standardtest mit (R,S)-Norreticulin als Substrat und 0,9 pkat NMT bestimmt. Verwendete Puffer (67 mM):

▲—▲ Citrat / NaOH, ○—○ Hepes / NaOH, ●—● Tris / HCl.

Abb. 38

Die wichtigsten Substrate der N-Methyltransferase werden mit dem an CPG-10 immobilisierten Enzym (2,5 pkat gegen (R,S)-Norreticulin) im Standardtest bei 20°C (s.o.) untersucht (s.Tab. 15). Die Substrate werden in einer Konzentration von 167 μ M eingesetzt, der pH-Wert in den Ansätzen beträgt 7,4.

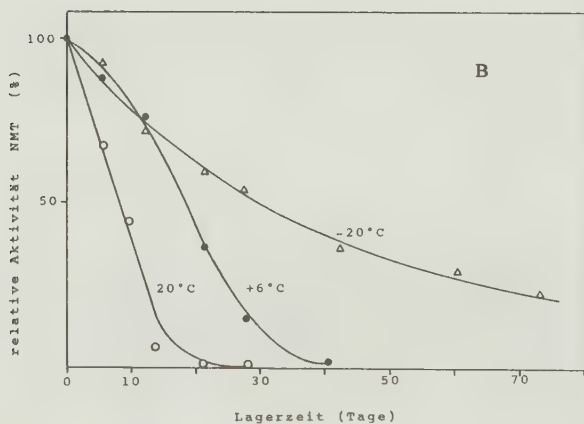
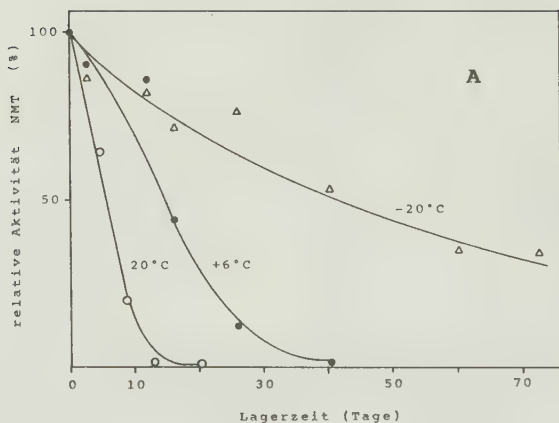
Substrat	relative Aktivität (%)	Stellung der Methylgruppen				
		N	6	7	3'	4'
(R)-Coclaurin	92	H	OMe	OH	H	OH
(S)-Coclaurin	100	H	OMe	OH	H	OH
(R)-Norlaudanosolin	0	H	OH	OH	OH	OH
(S)-Norlaudanosolin	0	H	OH	OH	OH	OH
(R)-Norreticulín	83	H	OMe	OH	OH	OMe
(S)-Norreticulín	45	H	OMe	OH	OH	OMe
(R)-Tetrahydropapaverin	100	H	OMe	OMe	OMe	OMe
(S)-Tetrahydropapaverin	34	H	OMe	OMe	OMe	OMe

Tabelle 15 Zusammenstellung der Benzylisochinolin Alkaloide, die als Substrate der an CPG-10 Glas immobilisierten N-Methyltransferasen aus *B. koetianeana* getestet worden sind. Angegeben sind die bei Raumtemperatur im Standardtest mit 2,5 pkat Enzym und 167 μ M Substrat bei pH 7,4 ermittelten, relativen Aktivitäten, bezogen auf (S)-Coclaurin.

Das Verhalten der immobilisierten N-Methyltransferase gegenüber diesen Substraten ist innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite mit dem der löslichen N-Methyltransferase vergleichbar (s.S. 109).

Auch für die immobilisierte N-Methyltransferase wird ein Vergleich ihrer Stabilität gegenüber dem löslichen Enzym angestellt. Von der CPG-10 Suspension und dem freien Enzym werden 2 ml-Anteile mit 0,05% NaN_3 versetzt, um mikrobiellem Wachstum während der Lagerzeit vorzubeugen. Die Ansätze, die unter 0°C gelagert werden, enthalten 20% Glycerin. Zusätzlich wird ein Ansatz mit CPG-10-NMT auf 50% Glycerin eingestellt, damit die Lösung bei -20°C nicht erstarrt. Ein weiterer Ansatz enthält kein Glycerin. In regelmäßigen Abständen wird den Proben ein Aliquot entnommen, und die Aktivität gemessen.

Die Halbwertszeiten sind der Tabelle 16 zu entnehmen. Wie schon bei der 4'-O-Methyltransferase festgestellt, bringt die Immobilisierung auch für die N-Methyltransferase keinen Stabilitätsgewinn. Auch bei tiefen Temperaturen ist die



Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Aktivität der (A) freien, löslichen NMT, und (B) der an CPG-10 Glas immobilisierten NMT bei verschiedenen Temperaturen.
 ○—○ 20°C, ●—● +6°C, △—△ -20°C/20% Glycerin.

Der Verlauf der Aktivität bei Lagerung bei -70°C entspricht in beiden Fällen dem bei -20°C, ebenso der der CPG-10-NMT bei -20°C in Gegenwart von 50 % Glycerin. Ohne Zusatz von Glycerin nimmt die Aktivität dieser Präparation genau so schnell ab, wie die der bei +20°C gelagerten.

Abb. 39

Haltbarkeit eng begrenzt, wenn auch der Zusatz von Glycerin eine beträchtliche Steigerung ermöglicht. WAT et al. (1986) berichten von der von ihnen untersuchten NMT, daß sie auch in Gegenwart von Glycerin beim Einfrieren zerstört wird, und bei +4°C wenigstens zwei Wochen stabil ist.

An CNBr-Sepharose und CH-Sepharose gebundene N-Methyltransferase besitzt ähnlich kurze Halbwertszeiten wie die an CPG-10 Glas immobilisierte.

Halbwertszeiten	20°C	+6°C	-20°C/0%G	-20°C/20%G	-20°C/50%G	-70°C
lösliche NMT	5 d	19 d	-	50 d	-	50 d
An CPG-10 Glas immobilisierte NMT	7 d	20 d	7 d	40 d	40 d	40 d

Tabelle 16 Gegenüberstellung der Halbwertszeiten des Aktivitätsverlustes der löslichen und der an CPG-10 Glas immobilisierten NMT, unter verschiedenen Lagerbedingungen. %G gibt den Glyceringehalt der Probe an.

4. Synthesen mit immobilisiertem Berberinbrücken-Enzym (BBE)

Ein Grund für die Erforschung der Biosynthese von Naturstoffen und der daran beteiligten Enzyme liegt in der Erwartung, diese Kenntnisse für neue, biomimetische Syntheseverfahren zu nutzen, oder die biologischen Katalysatoren selbst in solchen Prozessen einzusetzen. Für den Bereich der Protoberberin Alkaloide, im besonderen für Berberin, ist mit der vollständigen Beschreibung ihrer Bildung auf enzymatischer Ebene die Grundlage für diese Entwicklung gelegt. Es sind vor allem drei Enzyme, die die letzten Schritte in der Biosynthese des Berberins in stereo- und regiospezifischer Weise katalysieren, die mit üblichen chemischen Methoden kaum zu beherrschen sind. Deswegen erscheint es reizvoll, diese Enzyme, die aus Berberis Zellkulturen gewonnen werden können, für die Herstellung von Berberin nutzbar zu machen. Ausgangspunkt für eine derartige Synthese ist Reticulin, das mit üblichen Methoden darstellbar ist (SHAMMA, 1972). Bei den Enzymen handelt es sich im einzelnen um das Berberinbrücken-Enzym, das den Ringschluß vom (S)-Reticulin zu dem Tetrahydroprotoberberin (S)-Scoulerin katalysiert, um die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX), die die Aromatisierung in dem neu entstandenen Ring C durchführt, und letztlich um die Berberin Synthase, die die Methoxygruppe in Position 3 in die 2,3-Methylendioxybrücke des Berberins überführt. Die Methylierung der Stellung 9 des Berberins erfolgt in der Pflanzenzelle auch enzymatisch, könnte aber als letzter Schritt in dieser Synthese mit Methyljodid oder Diazomethan durchgeführt werden.

Diese Enzyme des Sekundärstoffwechsels sind nur in geringen Mengen an dem unüberschaubaren Gemisch an Zellproteinen beteiligt, und ihre Isolierung gestaltet sich dementsprechend aufwendig. Je knapper und kostbarer ein Enzym aber ist, das für Synthesezwecke genutzt werden soll, um so sinnvoller und rentabler wird es, das Enzym an einen Träger zu binden, und es in dieser Form wiederholt einzusetzen. Wie schon zu Beginn der Arbeit dargelegt (s.S.14) kommt es in vielen

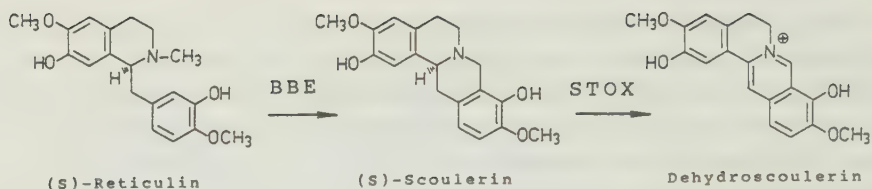
Fällen durch die Immobilisierung außerdem zu einer deutlichen Verbesserung der Haltbarkeit der Enzymaktivität. Daß dies jedoch nicht zwangsläufig der Fall ist, zeigen die Beispiele der in dieser Arbeit behandelten Methyltransferasen aus der Reticulin Biosynthese.

Von den drei benötigten Enzymen aus der Biosynthese des Berberins ist die Berberin Synthase von GALNEDER (1986) aus B. stolonifera Zellkulturen gereinigt und an CPG-10 Glas immobilisiert worden. Durch diese Art der Immobilisierung, die das Enzym für den Syntheseprozess in eine gut handhabbare Form bringt, konnte allerdings die sehr begrenzte Haltbarkeit des Enzyms von nur wenigen Tagen nicht verbessert werden. Dies wäre allerdings Bedingung um das Enzym rentabel einsetzen zu können. Andere Immobilisierungsverfahren mögen hier Abhilfe bringen.

Mit der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase, aus B. wilsoniae gewonnen, ist bereits ein erfolgreicher Ansatz für seine biotechnologische Nutzung mit der Razemattrennung von Benzylisochinolin Alkaloiden unternommen worden (AMANN, 1986). Auch für dieses Verfahren war die Bindung des Enzyms an einen unlöslichen Träger eine wichtige Voraussetzung, die dem Enzym eine um den Faktor 50 gesteigerte Haltbarkeit bei der Reaktionstemperatur (20°C) gegenüber dem freien Enzym verleiht.

In dieser Arbeit soll versucht werden, das Berberinbrücken-Enzym zu immobilisieren, und für den ersten Syntheseschritt in der beabsichtigten Sequenz zum Berberin einzusetzen.

Das Berberinbrücken-Enzym ist das Schlüsselenzym für den Weg von dem zentralen Verzweigungspunkt in der Biosynthese der Isochinolin Alkaloide - Reticulin - in die Richtung der Protoberberine. Es ist von STEFFENS (1984) aus B. beaniana Zellkulturen gereinigt und ausführlich beschrieben worden. Es katalysiert stereoselektiv und regiospezifisch den Ringschluß von (S)-Reticulin zu dem Tetrahydroprotoberberin (S)-Scoulerin.



Abfolge der Reaktionen, die durch Berberinbrücken-Enzym und S-Tetrahydroprotoberberin Oxidase aus Berberis beaniana katalysiert werden.

Abb. 40

Für die Isolierung und Reinigung des Berberinbrücken-Enzyms wird nach zwei Strategien vorgegangen. Die Gewebekultur von Berberis beaniana ist nach STEFFENS (1984) auf Grund ihres hohen Gehalts an Berberinbrücken-Enzym am besten für die Isolierung des Enzyms geeignet. Dieses Gewebe enthält aber neben Berberinbrücken-Enzym auch etwa dieselbe Menge an (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase, die nach STEFFENS (1984) nur durch hohen Reinigungsaufwand und entsprechend hohe Verluste an Berberinbrücken-Enzym abzutrennen ist. Da die Oxidase in der angestrebten Berberin Synthese ohnehin direkt im Anschluß an den Reaktionsschritt des Berberinbrücken-Enzyms folgen sollte, wird auf eine Trennung der beiden Enzyme verzichtet, um eine möglichst hohe Ausbeute an Berberinbrücken-Enzym-Aktivität bei der Isolierung zu erreichen. In einem zweiten Ansatz wird Berberinbrücken-Enzym aus Corydalis vaginans Zellkulturen isoliert. Nach Angaben von Dr. M. Rüffer (pers. Mitteilung) enthält dieses Gewebe keine nachweisbaren Mengen an STOX-Aktivität, und eignet sich so besonders zur Gewinnung von Berberinbrücken-Enzym, das frei von (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase ist. Mit einer solchen Enzympräparation wird die Synthese des Zwischenproduktes (S)-Scoulerin möglich.

4.1 Isolierung von Berberinbrücken-Enzym aus Berberis beaniana Zellkulturen

Die Isolierung des Berberinbrücken-Enzym erfolgt aus 530 g Frischgewicht (32 g Trockengewicht) tiefgefrorenem Gewebe von Berberis beaniana, das nach 11 Tagen Kultivierungsdauer geerntet worden ist. Wie beschrieben (s.S. 19) wird es mit 100 mM Phosphatpuffer pH 8 mit 5 mM Mercaptoethanol aufgeschlossen. Mercaptoethanol führt zwar langsam zu einer irreversiblen Hemmung von BBE (STEFFENS, 1984), wird aber im Aufschlußpuffer als Oxidationsschutz verwendet, ohne den sich der Rohextrakt innerhalb kurzer Zeit tiefbraun verfärbt und die Verluste an Enzymaktivität noch wesentlich drastischer sind. Im Verlauf der chromatographischen Reinigung des Enzyms wird 20 mM Phosphatpuffer pH 8 als Standardpuffer verwendet, ohne Zusatz von Mercaptoethanol.

Dem stark gelb gefärbten Rohextrakt werden die Alkaloide durch Adsorption an dextranbeschichtete Aktivkohle (5 % Aktivkohle, 1 % Dextran in Standardpuffer; 100 ml dieser Suspension werden pro 1000 ml Rohextrakt eingesetzt) entzogen (STEFFENS, 1984). Die Verluste an Protein belaufen sich bei dieser Prozedur auf 10-15 %, die damit der Abtrennung der Alkaloide durch Bindung an XAD (s.S. 57) deutlich unterlegen ist. Der so weitgehend entfärbte Rohextrakt wird einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung unterworfen. Das Protein, das im Bereich von 30-70 % Sättigung Ammoniumsulfat ausfällt, wird abzentrifugiert (GSA, 10.000/min, 15 min) und in Standardpuffer, der 10 % Sättigung Ammoniumsulfat enthält, gelöst. Durch die Ammoniumsulfat-Fällung werden offenbar weitere Alkaloide oder andere Hemmstoffe des Berberinbrücken-Enzyms abgetrennt, wodurch es zu einem Anstieg in der Gesamtaktivität der Präparation kommt.

Die weitere Reinigung umfaßt drei säulenchromatographische Schritte an Phenyl-Sepharose, DEAE-Sephacel und Gelfiltration an TSK-Fraktogel. Die Säuleneeluat werden mit dem Standardtest (s.S. 22) auf BBE-Aktivität hin durchgetestet.

Hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose

Der gelöste Niederschlag der Ammoniumsulfat-Fällung wird auf eine mit 10 % Sättigung Ammoniumsulfat in Standardpuffer äquilibrierte Phenyl-Sepharose Säule (2 cm ϕ x 20 cm; 60 ml Gelbett) aufgetragen. Die Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten in einem Volumen von 120 ml mit 30 % Ethylenglycol in Standardpuffer als Eluent. Die Flußrate beträgt 1 ml/min. Die BBE-Aktivität eluiert am Ende des Gradienten. Die aktiven Fraktionen werden gesammelt und gegen Standardpuffer dialysiert (5 l, 12 Stunden).

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel

Das dialysierte Eluat des Phenyl-Sepharose Schrittes wird auf eine mit Standardpuffer äquilibrierte DEAE-Sephacel Säule (2 cm ϕ x 20 cm; 60 ml Gelbett) aufgegeben. Die Säule wird mit einem linearen Gradienten bis 500 mM KCl in Standardpuffer in einem Volumen von 320 ml eluiert. Die Flußrate beträgt 0,75 ml/min. Die BBE-Aktivität eluiert in einem Bereich von 150-200 mM KCl. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt und mit einer 0,8 μ m Membran partikelfrei filtriert und durch Druckfiltration an einer PM 10 Membran (Amicon) auf etwa 5 ml eingeeengt.

Gelfiltration an TSK-Fraktogel

Das eingeengte Eluat der DEAE-Chromatographie wird an einer mit Standardpuffer äquilibrierten TSK Säule (2,4 cm ϕ x 85 cm; Gelbett 385 ml) mit einer Flußrate von 0,25 ml/min aufgetrennt. Die BBE-Aktivität kommt in dem Bereich von 180-210 ml Elutionsvolumen von der Säule. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt, und für die Immobilisierung des Berberinbrücken-Enzyms verwendet (s.S. 128).

Nach diesen drei Reinigungsstufen sind über 95 % des Proteins des Rohextraktes abgetrennt worden, bei einer Ausbeute

	Volumen (ml)	Gesamt- Protein (mg)	Spezif. Aktivität (pkat/mg)	Gesamt- Aktivität (nkat)	Ausbeute (%)	Reinigung (-fach)
Rohextrakt	1220	2210	4,5	9,9	90	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ - Fällung 30-70%	142	1290	8,5	11,0	100	2
Phenyl- Sephacel	122	320	29	9,3	85	6,5
DEAE- Sephacel	84	132	62	8,2	74	14
TSK- Fractogel	33	39	104	4,1	37	23

Tabelle 17 Übersicht über den Verlauf der Reinigung von Berberinbrücken-Enzym aus 530 g FG (32 g TG) 11 Tage altem Gewebe aus Zellkulturen von B. beaniana. Die Aktivität von BBE wird im Standardtest ermittelt.

von etwa 4 nkat Berberinbrücken-Enzym. Das sind knapp 40 % der Enzymaktivität des Ausgangsmaterials. Die genauen Daten der einzelnen Schritte sind der Tabelle 17 zu entnehmen. Der Gehalt an (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase in dieser Präparation ist nicht bestimmt worden, da der optische Test für dieses Enzym (s.S. 24) wegen der starken Eigenfärbung der BBE-Präparation nicht durchführbar ist. Die Rotfärbung der Testansätze für BBE, in denen das gebildete Scoulerin offenbar zu dem rotgefärbten Dehydroscoulerin oxidiert wird, weist aber deutlich auf seine Anwesenheit hin.

4.2 Isolierung von Berberinbrücken-Enzym aus Corydalis vaginans Zellkulturen

Für die Gewinnung von "STOX-freiem" Berberinbrücken-Enzym hat sich das Gewebe von Corydalis vaginans als besonders geeignet herausgestellt.

In einem Vorversuch soll die Abwesenheit der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase untersucht werden. Dazu werden 1 ml Rohextrakt aus diesem Gewebe (s.u.) zur Abtrennung von stö-

renden Alkaloiden mit 100 µl einer Suspension dextranbeschichteter Kohle (s.o.) inkubiert. Nach 10 Minuten wird abzentrifugiert, und der Überstand in der folgenden Umsetzung verwendet.

In einem Ansatz mit einem Volumen von 150 µl und 60 mM Glycin/NaOH pH 9, werden (S)-(N-¹⁴CH₃)-Reticulin (20.000 cpm; ca. 170 pmol. Um den Test sehr empfindlich zu gestalten wird kein unmarkiertes Reticulin zugesetzt) mit 100 µl des vorbereiteten Rohextraktes mit 70 fkat BBE-Aktivität bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Der Ansatz wird mit DC im Laufmittel 6 aufgetrennt. Die Radioaktivitätsverteilung des Chromatogramms zeigt, daß Reticulin (R_f 0,65) quantitativ zu Scoulerin (R_f 0,85) umgesetzt wird, ohne daß es zu einer Oxidation zu Dehydroscoulerin (R_f 0,5) kommt. Dieser Versuch beweist, daß auch mit einer äußerst empfindlichen Methode keine STOX-Aktivität in diesem Gewebe nachzuweisen ist.

Für die Isolierung von Berberinbrücken-Enzym wird von 730 g Frischgewicht (29 g Trockengewicht) tiefgefrorenem Gewebe von Corydalis vaginans ausgegangen, das nach 11 Tagen Kultivierungsdauer geerntet worden ist.

Der Aufschluß erfolgt wie bei der Isolierung des Berberinbrücken-Enzyms aus B. beaniana mit 5 mM Mercaptoethanol im Aufschlußpuffer. Für die weitere Reinigung wird wieder 20 mM Phosphatpuffer pH 8 ohne Zusatz von Mercaptoethanol als Standardpuffer verwendet.

Die Reinigung des Rohextraktes aus diesem Gewebe verläuft in Anlehnung an die ersten Stufen des Verfahrens für die 4'-O-Methyltransferase (s.S. 57) in drei chromatographischen Schritten an DEAE-Sephacel, Phenyl-Sepharose und TSK-Fraktogel. Der Vorteil gegenüber dem Reinigungsgang bei B. beaniana liegt darin, daß die zeitaufwendige Ammoniumsulfatfällung umgangen wird, und die Abtrennung der Alkaloide mit einer XAD Säule erfolgt, was zu keinen Proteinverlusten in diesem Schritt führt.

Die Säuleneluatate werden mit dem Standardtest auf BBE-Aktivität getestet, und die aktiven Fraktionen gesammelt und für

den jeweils folgenden Schritt vorbereitet, wie es in dem Protokoll für die Reinigung der 4'OMT (s.S. 57ff) angegeben ist. Das Ergebnis dieser Anreicherung von Berberinbrücken-Enzym aus Corydalis vaginans ist in Tabelle 18 zusammengefaßt.

	Volumen (ml)	Gesamt- Protein (mg)	Spezif. Aktivität (pkat/mg)	Gesamt- Aktivität (pkat)	Ausbeute (%)	Reinigung (-fach)
Rohextrakt XAD	1480	5420	0,06	325	95	1
DEAE- Sephacel	248	450	0,75	337	100	13
Phenyl- Sepharose	82	17,6	8,2	144	43	137
TSK- Fractogel	16	6,1	24	146	43	400

Tabelle 18 Übersicht über den Verlauf der Reinigung von Berberinbrücken-Enzym aus 730 g FG (29 g TG) 11 Tage altem Gewebe aus Zellkulturen von Corydalis vaginans. Die Aktivität von BBE wird im Standardtest ermittelt.

Die 400-fache Anreicherung des Enzyms in diesem Reinigungs-gang ist bedeutend besser als in dem Verfahren mit B. beaniana, was an dem deutlich niedrigeren Ausgangswert der spezifischen Aktivität liegen dürfte. Die Ausbeuten sind mit etwa 40 % beidemale vergleichbar. Insgesamt können über 99 % Fremdprotein abgetrennt, und 145 pkat BBE-Aktivität gewonnen werden.

Im Vergleich zu B. beaniana (21 nkat/kg Frischgewicht, 350 pkat/g Trockengewicht) ist der Gehalt an Berberinbrücken-Enzym in C. vaginans (470 pkat/kg FG, 12 pkat/g TG) außerordentlich gering. Um mit diesem Enzym Synthesen im mmol- oder Gramm-Bereich durchführen zu können, wofür mindestens 5-10 nkat Aktivität vorliegen sollten, wäre es notwendig Gewebe in der Größenordnung von 20-30 kg aufzuarbeiten.

Mit den beiden Enzympräparationen aus B. beaniana und C. vaginans sollen Versuche zur Immobilisierung des Berberinbrücken-Enzyms unternommen werden.

4.3 Immobilisierung des Berberinbrücken-Enzyms

In einem Vorversuch soll das geeignetste Trägermaterial, in Bezug auf seine Fähigkeit, maximale Mengen an aktivem Enzym zu binden, herausgefunden werden. In diesem Versuch werden aktivierte CH-, CNBr-, Tresyl-, AH- und Octyl-Sepharose sowie CPG-10 Glas eingesetzt. Dazu werden 4 mg BBE des TSK-Reinigungsschrittes aus B. beaniana mit 230 pkat Aktivität (bei Raumtemperatur ermittelt) mit jeweils 0,3 g (Trockengewicht) entsprechend vorbehandeltem Trägermaterial (s.S. 32) für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (das entspricht 13,3 mg Protein pro Gramm Trägermaterial). Von der Octyl-Sepharose werden 0,15 g feuchtes Gel verwendet, das mit H₂O ausgewaschen worden ist, und ohne weitere Behandlung mit dem Enzym versetzt wird. Diese Matrix bindet das Protein, im Gegensatz zu den anderen verwendeten Trägern, nicht kovalent, sondern über hydrophobe Wechselwirkungen.

Nach der Inkubation werden die Überstände abgezogen und die Trägersuspensionen, wie vorher beschrieben (s.S.33), ausgewaschen, verbliebene aktive Gruppen der Matrix mit Tris blockiert und mit Standardpuffer auf 1 ml aufgefüllt.

Die Aktivität der einzelnen Präparationen wird mit Aliquots in dem üblichen Standardtest (s.S. 22) bei Raumtemperatur (20°C) ermittelt. Die Ansätze werden während der Inkubationszeit mit einem Rotationsmischer bewegt. Für die Durchführung dieses Tests gelten entsprechende Überlegungen, wie sie in dem Kapitel über die immobilisierte N-Methyltransferase angestellt wurden (s.S. 115). Das Ergebnis des Vorversuchs ist in Tabelle 19 zusammengefaßt.

Träger	Protein gebunden	Aktivität
aktivierte CH-Sepharose	92 %	47 %
CNBr-Sepharose	95 %	43 %
Tresyl-Sepharose	72 %	15 %
Octyl-Sepharose	73 %	4 %
Glutardialdehyd-derivatisierte		
AH-Sepharose	98 %	30 %
CPG-10 Glas	100 %	65 %

Tabelle 19 Immobilisierung von 230 pkat Berberinbrücken-Enzym (4 mg Protein) an verschiedene Trägermaterialien (0,3 g TG). Der Anteil der gebundenen Aktivität bezieht sich auf das freie Enzym, und berücksichtigt nur den gebundenen Proteinanteil.

Wie schon bei der Bearbeitung der Enzyme der vorangegangenen Kapitel, stellt sich CPG-10 Glas als das günstigste Trägermaterial zur Immobilisierung des Berberinbrücken-Enzyms dar, und wird für die Fixierung der beiden beschriebenen BBE-Präparationen verwendet.

Von dem Berberinbrücken-Enzym (TSK-Reinigungsschritt) aus B. beaniana werden 35 mg Protein mit 2,1 nkat Enzymaktivität (bei 20°C ermittelt) mit 1,4 g CPG-10 Glas über Nacht bei +6°C inkubiert. Nach Auswaschen, Blockieren und Auffüllen der Suspension mit Standardpuffer auf 8 ml wird der gebundene Proteinanteil zu etwa 95 % bestimmt. Das immobilisierte Berberinbrücken-Enzym besitzt noch 85 % seiner Ausgangsaktivität, das sind 1,8 nkat. Vergleichbare Ansätze, bei denen - wie im Vorversuch - die Bindung an den Träger bei Raumtemperatur und kürzerer Inkubationszeit durchgeführt werden, erbringen deutlich niedrigere Ausbeuten an immobilisierter Enzymaktivität von 55-60 %, bei ebenfalls nahezu vollständiger Bindung des Proteins.

Wie schon bei der Isolierung des Berberinbrücken-Enzyms aus B. beaniana erwähnt worden ist, enthält diese Präparation einen nicht genau bekannten Anteil an (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase. Von der glasgebundenen Enzympräparation wird der Gehalt an STOX-Aktivität mit einem optischen Test

(s.S. 24) bei Raumtemperatur ermittelt. 50 μ l der Glassuspension werden mit 50 nmol (S)-Norreticulin bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wird die Extinktion des gebildeten 1,2-Dehydronorreticulin im Überstand bei 340 nm gemessen. Danach sind insgesamt 0,95 nkat STOX in gebundener Form aktiv. Zu beachten ist, daß die Messung der Aktivität des Berberinbrücken-Enzyms mit dem Tritium-Ausbau-Test, durch die mit diesem Test interferierende (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase zu hohe Werte ergibt (s.S. 23).

Von Berberinbrücken-Enzym (TSK-Reinigungsschritt) aus C. vaginans werden 5 mg mit 65 pkat an 0,5 g CPG-10 Glas gebunden (über Nacht, +6°C). Bei dieser Präparation werden 94 % des Proteins fixiert, wobei 80 % des BBE in gebundener Form noch aktiv sind.

4.4 Eigenschaften des an CPG-10 Glas immobilisierten Berberinbrücken-Enzyms

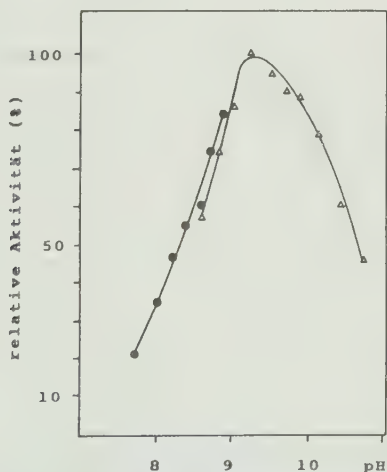
4.4.1 Identifizierung des Produktes der enzymatischen Reaktion

Das Produkt, das aus (S)-Reticulin nach der Umsetzung mit dem glasgebundenen BBE/STOX entsteht, wird dünnschichtchromatographisch untersucht. 100 nmol (S)-Reticulin werden mit 1,8 pkat an CPG-10 immobilisiertem Berberinbrücken-Enzym in einem üblichen Testansatz (s.S. 22) über Nacht bei 20°C inkubiert. Die Alkaloide des tiefrot gefärbten Ansatzes werden mit 100 μ l Isoamylalkohol extrahiert, und mit DC in Laufmittel 6 aufgetrennt. Als einziger Fleck ist eine rote Bande bei R_f 0,5, auf Höhe einer Referenz von Dehydroscoulerin zu erkennen. Weder Reticulin noch das Produkt des Berberinbrücken-Enzyms, Scoulerin, sind detektierbar. Die rote Bande wird mit Methanol, der 0,5% Essigsäure enthält, von der Kieselgelfolie extrahiert. Das Eluat wird zur Trockne eingengt, in wenig Methanol gelöst und mit einer Mikrospatelspitze NaBH_4 reduziert. Die farblose Lösung wird

mit DC in Laufmittel 3 aufgetrennt. Eine einzige Bande auf der Höhe der Referenz von Scoulerin (R_f 0,7) ist unter UV₂₅₄ zu erkennen. Sie wird mit Methanol extrahiert. Der eingeeengte Extrakt wird massenspektrometrisch untersucht. Die Fragmente m/z (rel.Intensität) 327 (48%) (Molekülpeak), 178 (100%), 163 (16%), 150 (50%), 135 (30%) und 107 (20%) stimmen genau mit denen einer authentischen Referenz von Scoulerin überein.

4.4.2 pH-Optimum

Um die maximale Aktivität der Enzympräparation für synthetische Zwecke nutzen zu können, ist die Kenntnis des pH-Optimums unerlässlich. Für das gelöste Berberinbrücken-Enzym (STEFFENS, 1984) war dieser Wert zu pH 9 bestimmt worden. Die Messungen für das immobilisierte Enzym werden mit dem



Bestimmung der pH-Abhängigkeit des an CPG-10 Glas immobilisierten Berberinbrücken-Enzyms aus *Berberis beaniana*. Die Aktivität wird im Standardtest mit 1 pkat BEE bestimmt. Verwendete Puffer (60 mM):

●—● Tris / HCl, △—△ Glycin / NaOH.

Abb. 41

üblichen Test durchgeführt, in den 1 pkat an Glas gebundenes Berberinbrücken-Enzym aus B. beaniana und 60 mM Puffer in 0,2 pH-Abstufungen über einen Bereich von pH 7,5 bis 10,5 eingesetzt werden. Inkubiert wird bei 20°C für 40 Minuten. Die Enzymaktivität zeigt für das immobilisierte Enzym ein Maximum in dem Bereich von pH 9,2-9,4.

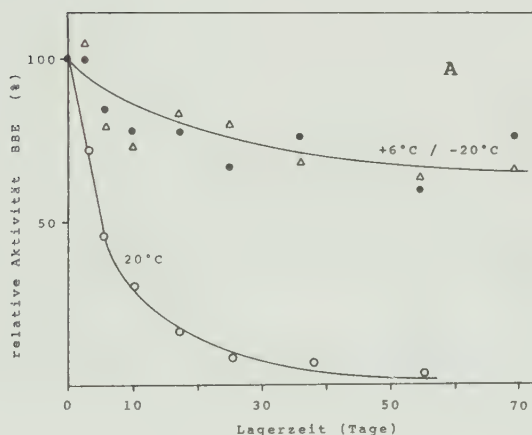
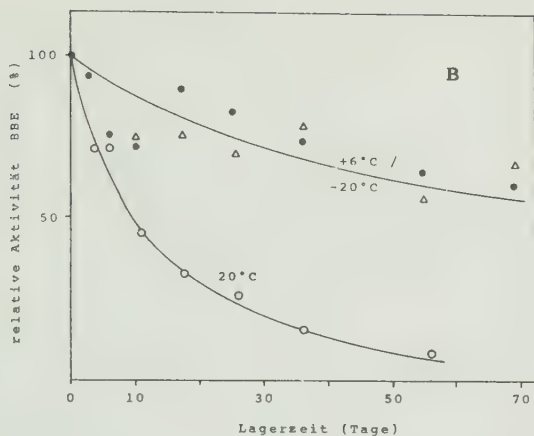
4.4.3 Stabilität des immobilisierten Berberinbrücken-Enzyms

Eine sinnvolle, rentable Nutzung der mit hohem Aufwand zu isolierenden und zu immobilisierenden Enzyme aus Pflanzenzellen erscheint nur dann möglich, wenn sie anschließend über einen langen Zeitraum in ihrer Leistungsfähigkeit erhalten bleiben. Ob sich die Immobilisierung an einen unlöslichen Träger für die Aktivität von Berberinbrücken-Enzym als eine Stabilisierung erweist, soll mit dem aus C. vaginans gewonnenen, und an CPG-10 Glas gebundenen Enzym bei +20°C, +6°C und bei -20°C untersucht werden. Parallel wird auch das freie Enzym, unter denselben Bedingungen gelagert, mitverfolgt. Gleiche Anteile der Glassuspension werden zur Vermeidung von mikrobiellem Wachstum auf 0,1% NaN₃ eingestellt. Die Probe die bei -20°C gelagert wird, enthält 20% Endkonzentration Glycerin. In regelmäßigen Abständen werden den Proben Aliquots entnommen und mit dem Standardtest geprüft.

Die Halbwertszeiten der Aktivitätsabnahme ergeben sich zu:

	20°C	+6°C	-20°C
BBE an CPG-10 gebunden	9 d	200 d	200 d
freies BBE	5 d	200 d	200 d

Die Bindung an CPG-10 Glas hat für eine Stabilisierung der Enzymaktivität bei Raumtemperatur also keine Bedeutung. Vergleichbare Versuche mit BBE an CNBr-Sepharose, aktivierte CH-Sepharose und AH-Sepharose gebunden, ergeben bei +20°C ebenfalls Halbwertszeiten zwischen 8 und 10 Tagen.



Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Aktivität des (A) freien, löslichen Berberinbrücken-Enzyms aus *Corydalis vaginans* und (B) des an CPG-10 Glas immobilisierten Berberinbrücken-Enzyms bei verschiedenen Temperaturen.

○—○ 20°C, ●—● +6°C, ▲—▲ -20°C/20% Glycerin.
100 % entsprechen 67 pkat/mg (A) und 3,3 pkat/ml (B).

Abb. 42

Die Tatsache, daß das Berberinbrücken-Enzym bei der Immobilisierung an CPG-10 Glas so geringe Aktivitätsverluste erleidet, könnte daran liegen, daß keine essentiellen Strukturen des Enzyms an der Bindung an die Matrix beteiligt sind. Diese Annahme legt die Vermutung nahe, daß eine weitere Behandlung des bereits immobilisierten Enzyms mit Glutardialdehyd die Aktivität des Enzyms nicht nachhaltig schädigen sollte. Möglicherweise kann aber durch eine zusätzliche oberflächliche Fixierung das Protein vor seiner thermischen Denaturierung geschützt werden.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, werden jeweils 3 pkat BBE, an CPG-10 gebunden, mit 0%, 0,01%, 0,05% und 0,1% Glutardialdehyd in Standardpuffer für 5 Stunden bei 20°C inkubiert. Die Ansätze werden gründlich mit Standardpuffer ausgewaschen, bis kein Geruch nach Glutardialdehyd mehr wahrzunehmen ist, und in 1 ml Standardpuffer mit 0,1% NaN₃ bei Raumtemperatur gelagert. Die Aktivität wird in regelmäßigen Abständen gemessen.

Die Behandlung mit Glutardialdehyd führt konzentrationsabhängig zu einer Inaktivierung von Berberinbrücken-Enzym: 0,01% - 96% Restaktivität; 0,05% - 62%; 0,1% - 38%. Entgegen der Erwartung wird die Lagerstabilität bei 20°C durch die Behandlung allerdings in keiner Weise verbessert.

4.5 Enzymatische Synthese von Dehydroscoulerin mit immobilisiertem Berberinbrücken-Enzym und (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase

Mit einer aus B. beaniana isolierten und an CPG-10 Glas immobilisierten Mischung von Berberinbrücken-Enzym und (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase sollen substantielle Mengen an Dehydroscoulerin hergestellt werden. In einem vergleichbaren Versuchsaufbau, wie er für die Synthese von SAM (s.S.46) verwendet worden ist, wird das glasgebundene Enzym in eine kleine Säule (1,4 cm Ø x 4cm) gepackt, durch die eine substrathaltige Pufferlösung gepumpt wird. Die Alkaloide werden im Anschluß an die Enzymsäule mit XAD aus dem

Puffer adsorbiert. Die Substratlösung und die XAD Säule werden im Kühlschrank aufbewahrt, während die Reaktion auf der Enzymsäule bei Raumtemperatur abläuft.

Für die Synthese werden 1 nkat BBE / 0,5 nkat STOX in einem Säulenvolumen von 2 ml eingesetzt. Die Substratlösung enthält 20 mM Glycin/NaOH pH 9,2 und 0,35 mM (S)-Reticulin. Um einen möglichst vollständigen Umsatz von Reticulin zu Dehydroscoulerin zu erreichen, wird die Flußrate auf einen Wert von 6 ml/h oder 2,1 $\mu\text{mol/h}$ ((S)-Reticulin) gestellt, so daß nur 60% der gemessenen Säulenaktivität von BBE für einen vollständigen Umsatz benötigt werden. Diese Anordnung wird über mehrere Tage betrieben. Alle 12 Stunden wird eine Probe nach der Enzymsäule entnommen, und mit HPLC-System E (s.S.27) analysiert.

Zu Beginn der Synthese werden etwa 50% des eingesetzten (S)-Reticulins zu Dehydroscoulerin umgesetzt. Scoulerin ist nur in Spuren zu detektieren. Die Syntheseleistung des immobilisierten Berberinbrücken-Enzyms ist also beträchtlich geringer, als sie im Standardtest vorher bestimmt worden war. Das ist vermutlich auf die starke Produkthemmung zurückzuführen, der das BBE unterliegt. Nach STEFFENS (1984) bewirkt Scoulerin bereits in einer Konzentration von 10 μM eine Halbierung der Reaktionsgeschwindigkeit. Die Wirkung von Dehydroscoulerin ist nicht untersucht worden, aber die ihm sehr ähnlichen methylierten Folgeprodukte aus der Biosynthese, Berberin und Jatrorrhizin, sind ebenfalls in einer Konzentration zwischen 5 und 30 μM in dieser Hinsicht wirksam. Diese Konzentrationen werden auch bei geringem Umsatz von Reticulin (350 μM) in der Reaktionslösung durchaus erreicht.

Im weiteren Verlauf der Synthese nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit immer weiter ab. Durch stufenweises Herabsetzen der Flußrate bis zuletzt auf 0,7 ml/h nach 5 Tagen, wird versucht, den Umsatz von Reticulin bei etwa 40% zu halten. Nach 6 Tagen wird der Versuch abgebrochen. 170 μmol (S)-Reticulin sind in dieser Zeit über die Säule gepumpt worden. Die Säule wird mit Wasser ausgewaschen. Dafür sind etwa 200 ml notwendig. Das entstandene Dehydroscoulerin

haftet offensichtlich sehr hartnäckig an dem Glasträger oder dem gebundenen Enzym. Auch das könnte eine Erklärung für die ständig weiter sinkende Aktivität des Enzyms sein, die sehr viel drastischer ausgefallen ist, als es nach der, in den Stabilitätstests ermittelten Halbwertszeit, zu erwarten gewesen wäre.

Die XAD Säule, die sich tiefrot eingefärbt hat, wird aus dem Kreislauf ausgebaut und mit Methanol eluiert. Eine Probe des Eluates wird mit DC in Laufmittel 6 analysiert. Neben einer breiten roten Bande bei R_f 0,5 sind nicht umgesetztes Reticulin R_f 0,65 und eine schwache Bande bei Scoulerin R_f 0,85 zu erkennen. Daneben liegen zahlreiche, nicht näher bestimmte Neben- und Zersetzungsprodukte als schwache Banden vor.

Die Reinigung des Syntheseproduktes erfolgt durch Säulenchromatographie an LH-20-Sephadex (3 cm ϕ x 30 cm) mit Methanol als Laufmittel. Es werden 50 ml Fraktionen gesammelt, von denen Proben mit DC in Laufmittel 6 untersucht werden. Die Dehydroscoulerin-haltige Fraktion enthält keine weiteren Verunreinigungen mehr. Der Gehalt wird photometrisch, unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von $E_{376} = 10,4$ für eine 1 mM Lösung in 20 mM Glycin/NaOH pH 9 (AMANN, 1986) bestimmt. Danach sind 52 μ mol Dehydroscoulerin hergestellt worden (17 mg). Das bedeutet einen 30%-igen Umsatz des eingesetzten (S)-Reticulins. Die Aktivität des Enzyms (im Standardtest bestimmt) kann also über den Zeitraum von 6 Tagen nur zu 10% genutzt werden.

Von dem synthetisierten Dehydroscoulerin werden UV-Spektren in alkalischem (0,2 mM NaOH) und saurem (0,2 mM Essigsäure) Methanol aufgenommen.

Im Alkalischen ist die Substanz rot gefärbt. Die Absorptionsmaxima (molarer Extinktionskoeffizient (10^6 cm²/mol)) liegen bei 252 nm (21,6); 376 nm (12,8); 514 nm (3,4); die Minima bei 318 nm (3,5) und 435 nm (1,3).

Im Sauren ist die Substanz gelb gefärbt. Die Maxima liegen bei 275 nm (19,0); 345 und 355 nm (13,1); 445 nm (3,3); die Minima bei 305 nm (5,5) und 388 nm (1,5).

4.6 Enzymatische Synthese von (S)-(^{13}C -8)-Scoulerin mit immobilisiertem Berberinbrücken-Enzym

In einem zweiten Syntheseansatz wird mit einem aus C. vaginans isolierten und an CPG-10 immobilisierten Berberinbrücken-Enzym Scoulerin hergestellt. Die geringe Enzymaktivität dieser Präparation (20 pkat) wird genutzt, um aus (S)-($\text{N-}^{13}\text{CH}_3$)-Reticulin (von Prof. N.Nagakura, Kobe, Japan synthetisiert) das entsprechend markierte (S)-(^{13}C -8)-Scoulerin herzustellen.

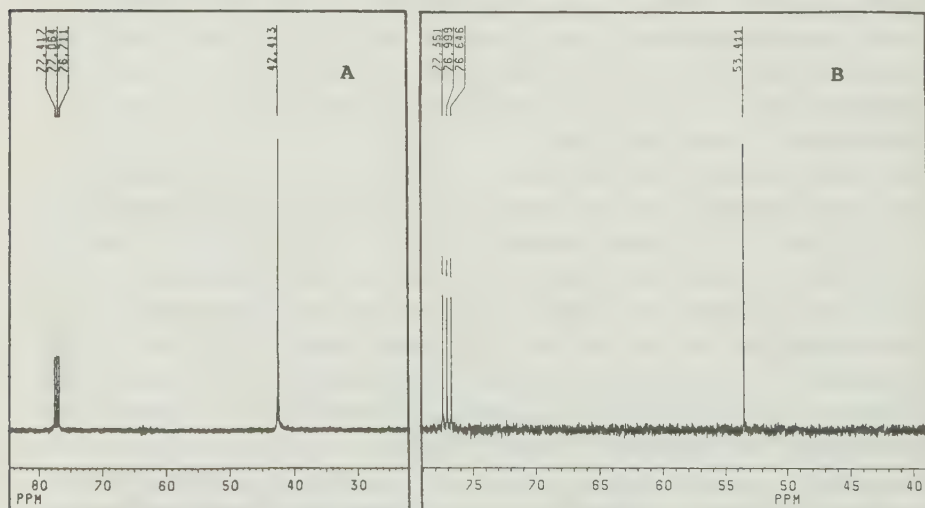
Der Aufbau und die Durchführung entsprechen der vorher beschriebenen Synthese. Weil dabei die starke Bindung des Reaktionsproduktes an das trägergebundene Enzym möglicherweise einen negativen Einfluß auf die Enzymaktivität ausgeübt hat, wird in einem Vorversuch zunächst geklärt, ob der Zusatz geringer Mengen Methanol oder DMSO zu der Substratlösung zu einer besseren Freisetzung des Produktes führt.

Dabei stellt sich heraus, daß schon 10% Methanol zu einer deutlichen Hemmung (35%) von BBE führt. 5% DMSO reichen dagegen aus, um die starke Bindung der Alkaloide an das immobilisierte Enzym zu verhindern, ohne daß die Enzymaktivität beeinträchtigt wird.

Die Substratlösung für die Synthese enthält 20 mM Glycin/NaOH pH 9,2, 5% DMSO und 15 μM (S)-($\text{N-}^{13}\text{CH}_3$)-Reticulin (99 Atom% ^{13}C). Diese Lösung wird mit 4 ml/h, oder 60 nmol/h über die Enzymsäule gepumpt. Bei einem vollständigen Umsatz wird die Aktivität des Enzym dabei zu 83% ausgenutzt. In regelmäßigen Abständen wird nach der Enzymsäule eine Probe entnommen und mit HPLC System E untersucht. Am Anfang der Synthese werden 93% des eingesetzten Reticulin zu Scoulerin umgesetzt. Allerdings nimmt auch bei diesem Versuch die Aktivität des Enzyms im Laufe der Zeit deutlich ab. Nach 8 Tagen, der Umsatz liegt bei 57% bei einer Aktivität von nur noch 2 pkat, wird der Versuch beendet. In dieser Zeit sind 6,1 μmol Reticulin über die Säule gepumpt worden.

Das Enzym wird mit 100 ml Wasser ausgewaschen und in Standardpuffer suspendiert. Der methanolische Extrakt der XAD

Säule wird eingeeengt und mit DC, Laufmittel 6, gereinigt. Neben den intensiven Banden von Reticulin (R_f 0,65) und Scoulerin (R_f 0,85) sind Spuren von Dehydroscoulerin und einigen anderen Verunreinigungen zu erkennen. Das Scoulerin wird mit essigsauerm Methanol von der Kieselgelfolie eluiert. Die Reinheit der Substanz wird mit HPLC System E geprüft. Es wird nur ein einziger Peak nach der für Scoulerin üblichen Retentionszeit von 14 Minuten detektiert. Die Lage der ^{13}C -Markierung wird mit ^{13}C -NMR überprüft. Die Substanz wird, in CDCl_3 gelöst, bei einer Frequenz von 90,556 MHz gemessen. Das einzige Signal tritt bei einer Verschiebung von 53,41 ppm auf (Standard ist TMS). In diesem Bereich liegt typischerweise das Signal von C-8 der Tetrahydroprotoberberine, wie Tetrahydropalmatrubin (zusätzlich 2-OCH₃) mit 53,7 ppm oder Nandinin (zusätzlich 2,3-OCH₂O) mit



^{13}C -NMR Spektrum von (A) (S)-(N- $^{13}\text{CH}_3$)-Reticulin und (B) dem daraus mit Berberinbrücken-Enzym hergestellten (S)-(^{13}C -8)-Scoulerin. Beide Substanzen sind in CDCl_3 gelöst, bei einer Frequenz von 90,556 MHz gemessen worden.

Abb. 43

53,5 ppm (SHAMMA und HINDENLANG, 1979). Wegen der geringen Substanzmenge (weniger als 1 mg) sind die nicht markierten C-Atome mit ihrem natürlichen ^{13}C -Gehalt nicht zu erkennen.

Die Ausbeute an (S)-Scoulerin wird photometrisch bestimmt, mit $E_{283} = 7,08$ (SHAMMA, 1972) für eine 1 mM Lösung.

2,6 μmol (S)-(^{13}C -8)-Scoulerin (0,85 mg) sind so synthetisiert worden, das sind 43% des eingesetzten (S)-Reticulins. Die durchschnittliche Aktivität der Enzymsäule beträgt mit 4 pkat nur 20% der erwarteten Leistung.

Die Aktivität der gut ausgewaschenen Enzymsuspension nach dieser Synthese wird mit einem Aliquot im Standardtest ermittelt. Danach besitzt das Enzym tatsächlich nur noch 30% seiner Ausgangsaktivität. Der Syntheseprozess führt offenbar zu einer irreversiblen Schädigung des Enzyms, noch über die normale thermische Inaktivierung, wie sie in der Untersuchung über die Enzymstabilität bestimmt worden ist, hinaus. Die Ursachen dafür bleiben unbekannt.

5. Enzymatische Synthesen radioaktiv markierter Alkaloide

Als vor über dreißig Jahren damit begonnen wurde, radioaktiv markierte Vorstufen bei den Untersuchungen von Stoffwechselwegen einzusetzen, war dies ein wichtiger Schritt in dem Vorhaben, die verschlungenen Pfade der Biosynthese von Naturstoffen zu entschlüsseln. Diese Art der Markierung erlaubt es, noch geringste Substanzmengen und Umsätze enzymatischer Reaktionen sicher nachzuweisen, und es gelingt, das Schicksal einer applizierten Probe, in vivo und in vitro, genau zu verfolgen.

Reticulin etwa, als zentraler Verzweigungspunkt in der Biosynthese der Isochinolin Alkaloide lange bekannt (SHAMMA, 1972), hat sich als ideale Vorstufe in Fütterungsexperimenten zur Erforschung der vielfältigen Strukturen dieser Substanzklasse bewährt. Gerade durch die Verwendung markierter Vorstufen war es möglich, Gemeinsamkeiten und solche Verzweigungsstellen in Biosynthesewegen strukturell unterschiedlicher Naturstoffe herauszufinden. Aber auch für in vitro Untersuchungen sind diese Tracer unabdingbar für einfache, schnelle und sichere Testsysteme für enzymatische Reaktionen.

Der Vorteil der hohen Sensitivität beim Nachweis einer radioaktiven Markierung kann sich aber meist nur auswirken, wenn es gelingt, die Vorstufen mit einer hohen spezifischen Radioaktivität herzustellen, um damit wirklich mit Substratkonzentrationen im physiologischen Bereich arbeiten zu können. Bei Fütterungsexperimenten ist außerdem die Verdünnung der Markierung durch den zelleigenen Gehalt der verabreichten Vorstufe zu berücksichtigen. Die Herstellung solcher Vorstufen steht damit vor dem Problem, nur geringste Mengen von Substanz, im Nano- oder Mikromol-Bereich umsetzen zu müssen. Diese Miniaturisierung bereitet bei rein chemisch orientierten Synthesen oft ähnlich große Probleme, wie sie im umgekehrten Sinn beim scale-up vom Labor- in den Produktionsmaßstab bei üblichen Herstellungsverfahren auftreten. Die Verwendung von Enzymen zur Herstellung von markierten

Vorstufen bietet sich an, um diese Schwierigkeit zu überwinden. Die Vorteile der enzymatischen Synthese gelten in besonderem Maße für diese Anwendung, bei der Probleme, wie geringe Produktivität und kurze Lebensdauer der Enzyme, wegen der minimalen, umzusetzenden Substanzmengen keine Rolle spielen. Besonders wichtig erscheint bei dem Umgang mit radioaktivem Material ein möglichst einfacher Synthesablauf mit geringstem apparativen Aufwand, wie er bei einer enzymatischen Reaktion in einem Batchverfahren realisiert werden kann.

Die für die Untersuchung des Berberinbrücken-Enzyms wichtigen (R)- und (S)-(N-C³H₃)-Reticulin und (N-¹⁴CH₃)-Reticulin sind bereits von STEFFENS (1984) mit Hilfe der Norreticulin N-Methyltransferase aus B. wilsoniae (WAT et al., 1986) hergestellt worden, wobei etwa 40-50% der eingesetzten Radioaktivität im Produkt isoliert werden konnte.

Mit den in dieser Arbeit näher beschriebenen N- und O-Methyltransferasen aus Berberis Zellkulturen und entsprechend radioaktiv markiertem SAM sollte es möglich sein, Reticulin und seinen potentiellen biosynthetischen Vorläufer Norreticulin, die je nach der beabsichtigten Verwendung, gezielt in einer der drei bzw. zwei Methylgruppen die Markierung tragen, nach einer ähnlichen Methode herzustellen.

5.1 Synthese von ³H- und ¹⁴C- markiertem Reticulin

Die Reaktionen werden in einem möglichst kleinen Volumen durchgeführt, in dem standardmäßig 50 mM Hepes pH 7,5 und 10 mM Ascorbat als Oxidationsschutz enthalten sind. Das genaue Volumen der Ansätze hängt von der verwendeten Menge SAM und Enzym ab, und variiert deswegen in dem Bereich von 0,3-3,2 ml.

Als Cosubstrat wird in der Reaktion C³H₃- und ¹⁴CH₃-markiertes SAM verwendet, mit einer spezifischen Radioaktivität von 85 Ci/mmol (³H) bzw. 59 mCi/mmol (¹⁴C). Die Herstellung ist vorher beschrieben worden (s.S. 48). Die radiochemische

Reinheit dieser SAM-Präparationen variiert zwischen 70-90%. In Tabelle 20 sind die effektiv eingesetzten Mengen für jede Synthese angegeben.

Für die Synthesen werden ausschließlich lösliche Enzyme verwendet, die, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, aus Berberis koetianeana Zellkulturen isoliert und gereinigt worden sind. Für die Synthese von (S)-(6-O-C³H₃)-Reticulin kann die pflanzliche 6-O-Methyltransferase nicht verwendet werden, da sie das bereits N-methylierte Substrat 4'-O-Methylaudanosolin nicht umsetzt. Dafür wird kommerzielle Catechol-O-Methyltransferase (COMT) aus Schweineleber (Sigma) verwendet. Dieses Enzym besitzt eine geringe Aktivität gegenüber Benzylisochinolin. Sie beträgt im Standardtest (s.S. 21) mit 4'-O-Methylaudanosolin als Substrat etwa 3% der Aktivität gegenüber Dihydroxybenzoesäure, dem Standardsubstrat dieses Enzyms (BORCHARD, 1981).

In den Synthesen mit C³H₃-SAM wird das Enzym in bis zu zehnfachem Überschuß gegenüber der rechnerisch benötigten Menge eingesetzt, mit der die Synthese innerhalb von 2 Stunden beendet werden kann. Dies ist notwendig, weil mit sehr geringen SAM-Konzentrationen gearbeitet wird, die zudem vollständig umgesetzt werden sollen, und die Reaktion schnell ablaufen soll, um einer möglichen Zersetzung von SAM zuvorzukommen.

Bei dem Ansatz mit ¹⁴CH₃-SAM dauert die Reaktion, wegen der 100-fach höheren Substanzmenge etwa 26 Stunden bis zum vollständigen Umsatz.

Um den Verlauf der Reaktion verfolgen zu können, werden dem Ansatz kleinste Proben (weniger als 1 µl) entnommen und mit DC in Laufmittel 3 untersucht, um die Bildung von Reticulin zu verfolgen, und in Laufmittel 2, um den vollständigen Verbrauch von SAM zu erkennen.

Nach Ende der Reaktion wird das gebildete Reticulin mit verschiedenen Methoden aufgearbeitet. Bei einigen Ansätzen wird der pH mit 0,1 N NaOH auf 9-10 eingestellt und anschließend der Ansatz 8 mal mit 500 µl Ethylacetat erschöpfend extrahiert. Da auf diese Weise zwar nicht umge-

setztes SAM abgetrennt wird, nicht aber das Alkaloid-Substrat der Reaktion, wird der Ethylacetatextrakt, nachdem er unter N_2 eingeeengt worden ist, mit DC in Laufmittel 3 aufgetrennt. Die radioaktive Bande wird mit 20-30 ml MeOH von der Kieselgelfolie eluiert. Das Eluat wird unter N_2 zur Trockne eingeeengt, und in 500 μ l 0,5 mM HCl aufgenommen.

Da sich die Extraktion mit Ethylacetat als umständlich und als Gefahrenquelle für mögliche Kontaminationen des Arbeitsplatzes erwiesen hat, und eine weitere Reinigung des Produktes dennoch notwendig ist, wird bei einigen Ansätzen darauf verzichtet. In diesen Fällen wird der gesamte Ansatz auf mehrere DC-Folien (ca. 500 μ l pro Folie) aufgetragen, und in einem Schritt SAM und Substrat abgetrennt (Laufmittel 3). Die Elution erfolgt wie oben angegeben.

Die unterschiedlichen Parameter der einzelnen Syntheseansätze sind in Tabelle 20 angegeben.

Zum Nachweis der Identität der verschiedenen markierten (S)-Reticulin Spezies, werden je 30.000 cpm davon mit Berberinbrücken Enzym aus C.vaginandans umgesetzt, wie es vorher beschrieben worden ist (s.S. 126). In allen Fällen findet vollständiger Umsatz zu Scoulerin statt.

5.2 Enzymatische Synthese von (R)- und (S)-(6-O¹⁴CH₃)-Norreticulin

Für die Synthese von markiertem Norreticulin mit pflanzlichen Methyltransferasen bieten sich nicht so viele Möglichkeiten wie für die von Reticulin. Wie die Untersuchung der Substratspezifität dieser Enzyme ergeben hat (s.S. 53) wird von dem einen in Frage kommenden Substrat, 6-O-Methylnorlaudanosolin, nur die (S)-Konfiguration von der 4'-O-Methyltransferase umgesetzt, und das nur in sehr geringem Ausmaß. Diese Position ist in guten Ausbeuten enzymatisch kaum zu methylieren. Von der anderen möglichen Ausgangssubstanz, 4'-O-Methylnorlaudanosolin, wird das (S)-Enantiomere von der 6-O-Methyltransferase kaum umgesetzt. Deswegen soll versucht

Produkt	Substrat	nmol	SAM	Enzym	Volumen μl	Zeit(h)/ Temp.(°C)	Reinigung	Ausbeute % μCi
(R)-(N-C ³ H ₃)-Reticulin	(R)-Norreticuliculin	200	³ H 6,6 560	NMT 11	2750	1,5 / 37	Extraktion	88 490
(S)-(N-C ³ H ₃)-Reticulin	(S)-Norreticuliculin	100	³ H 6,6 560	NMT 8	2370	1,2 / 37	Extraktion	75 421
(S)-(6-O-C ³ H ₃)-Reticulin	(S)-4'-O-Methyllaudanosolin	200	³ H 1,2 103	COMT 0,9	300	1,5 / 30	DC	88 91
(S)-(4'-O-C ³ H ₃)-Reticulin	(S)-6-O-Methyllaudanosolin	10	³ H 3,7 300	4'OMT 15	1060	1 / 37	DC	93 278
(S)-(N- ¹⁴ CH ₃)-Reticulin	(S)-Norreticuliculin	1000	¹⁴ C 507 30	NMT 80	3200	26 / 30	Extraktion	76 23
(R)-(6-O- ¹⁴ CH ₃)-Norreticuliculin	(R)-4'-O-Methylnorlaudanosolin	1000	¹⁴ C 140 8,3	6 OMT 9	2820	8 / 37	HPLC	56 4,5
(S)-(6-O- ¹⁴ CH ₃)-Norreticuliculin	(S)-4'-O-Methylnorlaudanosolin	1000	¹⁴ C 140 8,3	COMT 6	1020	12 / 30	HPLC	64 5,2

Tabelle 20 Zusammensetzung der Ansätze zur enzymatischen Synthese von ³H- und ¹⁴C-markiertem Reticulin und Norreticuliculin. Alle Ansätze enthalten zusätzlich 50 mM Hepes pH 7,5 (Ansatz mit 4'OMT pH 8) und 10 mM Ascorbat. NMT, 4'OMT und 6 OMT sind aus B. koetiana isoliert worden, COMT stammt aus Schweineleber. Die Aktivität der Enzyme ist im Standardtest ermittelt worden. Zeit und Temperatur bezeichnen die Inkubationsdauer und -temperatur. Die Art der Reinigung der Produkte ist im Text erläutert. Die Ausbeute bezieht sich auf die eingestuzte Radioaktivität.

werden, (R)-4'-O-Methylnorlaudanolin mit der 6-O-Methyltransferase aus B. koetianeana umzusetzen, und (S)-4'-O-Methylnorlaudanolin mit Catechol-O-Methyltransferase aus Schweineleber.

Die Reaktion wird, wie bei den Synthesen von Reticulin beschrieben, durchgeführt. Die genauen Parameter sind in Tabelle 20 zusammengefaßt.

Für die Reinigung des gebildeten Norreticulins können die für Reticulin angegebenen Verfahren nicht verwendet werden, weil Norreticulin im Alkalischen offenbar nicht beständig ist. Nach DC in Laufmittel 3 (enthält Diethylamin) läßt sich kein intaktes Norreticulin von der Kieselgelfolie zurückgewinnen, und die alkalische Extraktion des Reaktionsansatzes mit Ethylacetat liefert nur verschiedene unbekannte Zersetzungsprodukte.

Die Abtrennung des Norreticulins aus dem Reaktionsansatz wird mit HPLC System C (s.S. 26) durchgeführt (Laufmittel ca. pH 4). Vorversuche haben gezeigt, daß damit verdünnte Proben bis zu einem Volumen von 5 ml aufgetrennt werden können, ohne daß die Trennleistung dadurch eingeschränkt werden würde. Die Ansätze werden nach Ende der Reaktion abzentrifugiert (5 min; 10.000 g) und die Überstände auf die HPLC aufgegeben. Der Lauf wird in 200 µl Schritten fraktioniert. Die Radioaktivität findet sich zum Teil in dem Eluat, das die nicht an die Säule gebundenen Bestandteile des Ansatzes enthält, und vor allem in den Fraktionen, die mit dem für Norreticulin typischen Signal des UV-Detektors nach 16 min zusammenfallen. Diese Fraktionen werden vereinigt, mit wenigen Tropfen NH_4OH alkalisiert und mehrfach mit 1-2 ml CHCl_3 erschöpfend extrahiert. Diese Extraktion verläuft ohne Verlust des gebildeten Norreticulins. Das Chloroform wird mit N_2 abgeblasen und der Rückstand in 500 µl 0,5 mM HCl gelöst. Insgesamt verlaufen die Norreticulin Synthesen mit deutlich schlechteren Ausbeuten (55-65%), bezogen auf das eingesetzte SAM, als die von Reticulin (80-90%).

Das gebildete (R)- und (S)-(6-O- $^{14}\text{CH}_3$)-Norreticulin wird

durch enzymatische N-Methylierung zu Reticulin, auf seine Identität geprüft. In zwei getrennten Ansätzen mit 170 μ l Volumen werden je 100 nmol unmarkiertes und 30.000 cpm markiertes (R)- bzw. (S)-(6-O- 14 CH $_3$)-Norreticulin, mit 200 nmol SAM und 3 pkat NMT aus B. koetinea (s.S. 113) für 17 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Ansätze werden mit HPLC-System C analysiert. Für beide Ansätze werden vom UV-Detektor und der Radioaktivitätsbestimmung ein neuer Peak nach der für Reticulin üblichen Retentionszeit (12,1 min) angezeigt. Das markierte wie das unmarkierte Norreticulin sind etwa im selben Ausmaß N-methyliert worden.

6. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von Berberinbrücken-Enzym und Berberin Synthase mit Hilfe chiraler Methylgruppen

(Die Arbeiten zu diesem Kapitel sind in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Floss, OSU, Columbus/Ohio durchgeführt worden. Von diesem Arbeitskreis wurde das chirale Methionin hergestellt und die Abbauten der chiral markierten Alkaloide vorgenommen sowie die Chiralitätsuntersuchungen der daraus gewonnenen Methylgruppen.

Die eigenen Arbeiten umfassen die hier beschriebene Synthese von chiraalem SAM, dessen enzymatische Umsetzung zu den entsprechend markierten Alkaloiden sowie deren weitere enzymatische oder in vivo Umsetzung mit Berberis Kalluskulturen.)

Die Biosynthese des Protoberberin Alkaloids Berberin ist heute in allen enzymatischen Schritten bekannt. Dennoch ist der Mechanismus einzelner daran beteiligter Reaktionen und deren sterischer Verlauf nicht geklärt. Dazu gehört die Übertragung der Methylgruppe von SAM auf die OH- und N-Stellungen der Benzylisochinoline und vor allem die Bildung der Berberinbrücke und ihre anschließende Dehydrierung, sowie die Bildung der Methylendioxybrücke und ihre nachfolgende Öffnung zum Jatrorrhizin. Untersuchungen mit chiral markierten Methylgruppen stellen eine Möglichkeit dar, Einblick in den Verlauf dieser Reaktionen zu erhalten.

6.1 Einführung in die Arbeitsweise mit chiralen Methylgruppen

Methylengruppen, $R_1-CH_2-R_2$, wie sie im Berberin untersucht werden sollen, sind achiral. Die beiden Wasserstoffe sind aber, bezüglich ihrer Lage im Raum, nicht identisch. Aus dem Methylenkohlenstoff entsteht bei einer Substitutionsreaktion, bei der einer der beiden Wasserstoffe gegen einen neuen Liganden ausgetauscht wird, ein chirales Zentrum. Die Konfiguration dieses chiralen Zentrums hängt davon ab, welcher der beiden Wasserstoffe in die Reaktion einbezogen wird. Die Stellung der beiden Wasserstoffe wird deshalb als enantiotop bezeichnet und, je nachdem, ob der Ersatz in dieser Stellung zu einem R- oder S-konfigurierten Zentrum führt, darüberhinaus als pro-R oder pro-S. In einer chiralen Umgebung, wie sie von einem Enzym geschaffen wird, werden Reaktionen an dieser prochiralen Methylengruppe stereospezifisch ablaufen, also zur Abspaltung nur des in der pro-R oder pro-S Stellung befindlichen Wasserstoffes führen. Der Nachweis eines solchen stereospezifischen Verlaufes einer Reaktion gelingt, wenn die beiden unterschiedlichen Stellungen in der Methylengruppe mit verschiedenen Wasserstoffisotopen stereospezifisch markiert werden, von denen Tritium durch einfache Radioaktivitätsmessung verfolgt werden kann.

Eine Untersuchung im Hinblick auf einen möglichen stereospezifischen Verlauf einer Reaktion einer Methylgruppe erscheint dagegen auf den ersten Blick fragwürdig, handelt es sich bei Methylgruppen doch um Zentren, die nahezu ideal symmetrisch sind. Doch auch an solchen achiralen Gruppen können enzymatische Reaktionen stereospezifisch, das heißt unter Wahrung, oder genau vorgegebener Änderung der räumlichen Anordnung der einzelnen Liganden ablaufen. Nur geschieht dies im Verborgenen, da die Liganden der Methylgruppe in ihrer räumlichen Anordnung nicht unterscheidbar sind. Der sterische Verlauf solcher Reaktionen läßt sich aber sichtbar machen, wenn die Methylgruppe in geeigneter Weise

markiert wird. Eine solche Markierung ersetzt die drei Wasserstoffe durch die drei Wasserstoffisotope, wodurch ein chirales Zentrum, die chirale Methylgruppe entsteht. Aus der Veränderung oder Beibehaltung der Konfiguration an einer, in eine enzymatische Reaktion einbezogenen chiralen Methylgruppe, lassen sich Rückschlüsse auf den sterischen Ablauf dieser Reaktion ziehen. Diese Methodik wurde von den Arbeitsgruppen von Cornforth (CORNFORTH et al., 1969) und Arigoni (LÜTHY et al. 1969) eingeführt.

Ein Verfahren zur Untersuchung einer enzymatischen Reaktion mit dieser Methode, beginnt mit der Synthese der chiralen Methylgruppe mit bekannter Konfiguration und ihrem Einbau in das zu untersuchende Substrat. Nach der enzymatischen Umsetzung, deren sterischer Verlauf beobachtet werden soll, wird das Produkt in der Regel abgebaut, um die Methylgruppe zurückzugewinnen und einer Chiralitätsanalyse zu unterziehen. Alle Reaktionen, die während dieses Verfahrens auf die chirale Methylgruppe angewendet werden, müssen in ihrem sterischen Verlauf natürlich bekannt sein, und dürfen zu keiner Razemisierung führen.

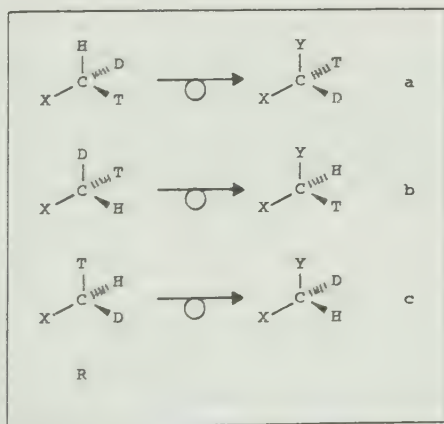
6.2 Bestimmung der Konfiguration von chiralen Methylgruppen

Der entscheidende Punkt der ganzen Methode ist die genaue Bestimmung der absoluten Konfiguration der chiralen Methylgruppe vor und nach der zu beobachtenden Enzymreaktion. Die enantiomeren Methylgruppen lassen sich nicht mit Methoden untersuchen und unterscheiden, wie sie für Stereoisomere üblicherweise angewendet werden, da die Auswirkung dieser Chiralität auf die Drehung der Ebene des polarisierten Lichtes weit unter der Nachweisgrenze liegt. Die Analytik macht sich ihrerseits die bekannte und genau bestimmte Stereospezifität von Enzymen zu Nutze (vergl. FLOSS und TSAI, 1979). Der Einsatz von Enzymen für diesen analytischen Zweck demonstriert gleichzeitig das Potential, das, im umgekehrten Sinn, die Verwendung chiraler Methyl- oder Methylengruppen für die Offenlegung unbekannter Reaktionsmechanismen anderer

Enzyme besitzen kann.

Der erste Schritt zur Bestimmung der Konfiguration einer chiralen Methylgruppe besteht in der irreversiblen und mit bekannter Stereochemie verlaufenden Überführung in eine prochirale Methylengruppe. Abb. 44 zeigt die drei möglichen Produkte einer solchen Umwandlung. Das Produkt c mit Wasserstoff und Deuterium als Ligand, das das Tritium bei dieser Reaktion verloren hat, wird bei der weiteren Untersuchung nicht mehr erfaßt. Diese Reaktion muß als weitere Voraussetzung einen ausgeprägten kinetischen Isotopeneffekt aufweisen, das heißt, der Austausch von Wasserstoff gegen den neuen Liganden muß schneller, effektiver ablaufen als der von Deuterium. Dies ist notwendig, damit es zu einer Ungleichverteilung von Tritium in die Stellungen pro-R und pro-S der Methylengruppe kommt. Produkt b entsteht dann zu weniger, und Produkt a zu mehr als 50%.

Dieses Ungleichgewicht, dessen Lage nur von der ursprüng-



Darstellung der drei möglichen Isotopen-Kombinationen bei der Überführung einer chiral markierten Methylgruppe in eine Methylengruppe. Der gezeigte Verlauf läuft mit Inversion ab. (Nach FLOSS und TSAI, 1979)

Abb. 44

lichen Konfiguration der Methylgruppe abhängt, ist nun in einem zweiten Schritt, mit einer enzymatischen Nachweisreaktion direkt meßbar. Bedingung ist, daß diese Reaktion, wiederum stereospezifisch, den Wasserstoff nur aus der pro-R oder pro-S Stellung der neu entstandenen Methylengruppe abspaltet. Das Ausmaß der Retention oder Abspaltung von Tritium ist deshalb ein Maß für die Konfiguration der in diese Analyse eingesetzten Methylgruppe.

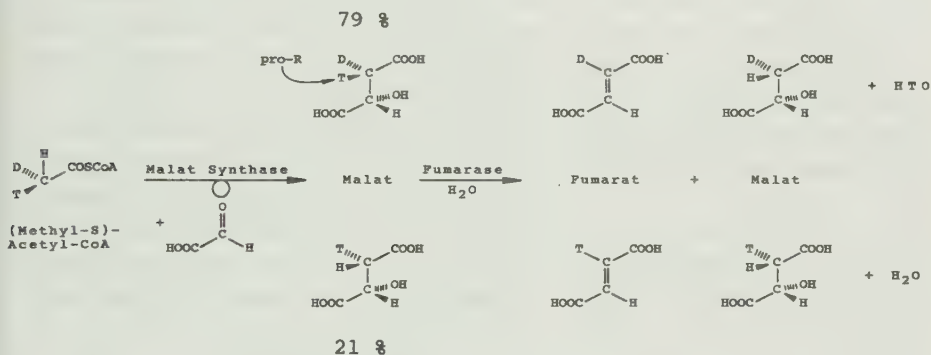
Als Enzymsystem für diese Analyse wird Malat Synthase und Fumarase verwendet (CORNFORTH et al. 1970). In die Malat Synthase Reaktion wird die chirale Methylgruppe in Form von Acetyl-CoA eingesetzt und mit Glyoxal zu Malat umgesetzt. Diese Reaktion verläuft mit Inversion, das heißt, die Konfiguration der chiralen Methylgruppe kehrt sich um. Der intramolekulare Isotopeneffekt k_H/k_D der Malat Synthase beträgt 3,7 (LENZ und EGGERER, 1976). Das gebildete Malat wird mit Fumarase behandelt, die stereospezifisch die Stellung pro-R dehydriert und wieder hydriert, und ein Gleichgewicht zwischen Malat und Fumarat einstellt. Auf diese Weise wird der Ligand in dieser Stellung vollständig mit Wasserstoff aus dem Lösungsmittel ausgetauscht. Abb. 45 zeigt den Ablauf dieser Reaktion für eine S-Methylgruppe.

Dieses Nachweissystem ist genau kalibriert worden, so daß eine direkte Umrechnung von der Tritiumretention der Fumarase Reaktion auf die ursprüngliche Konfiguration möglich ist (LENZ und EGGERER, 1976). Der prozentuale Anteil Tritium, der bei der Fumarase Reaktion in Malat und Fumarat erhalten bleibt, wird als F-Wert bezeichnet. F=50%, also 50% Tritiumretention bedeutet, daß es sich um eine achirale oder razemische Methylgruppe gehandelt hat. In einem solchen Fall kann sich der Isotopeneffekt der Malat Synthase nicht auswirken, und Tritium wird zu genau gleichen Teilen in die pro-R wie auch in die pro-S Stellung gelangen, und damit in der Fumarasereaktion zu 50% abgebaut. Bei F=79% (50%+29%) hat eine R-konfigurierte und bei F=21% (50%-29%) eine S-konfigurierte Methylgruppe der Essigsäure vorgelegen. Die

Analyse liefert meistens nicht diese idealen Werte. Der Enantiomeren Überschuß ee errechnet sich zu:

$$ee = |50-F| / 29 \times 100\%.$$

Dieser Wert ist ein Maß für die stereochemische Reinheit der Methylgruppe (FLOSS und TSAI, 1979).



Schema der Malat Synthase / Fumarase Reaktion, die für die Bestimmung der Konfiguration chiral markierter Essigsäure verwendet wird. Die Malat Synthase Reaktion führt zu einer Inversion der Konfiguration der Methylgruppe, und weist einen positiven Isotopeneffekt auf. Die Fumarase Reaktion führt stereospezifisch zu einem Austausch des in pro-R Stellung befindlichen Liganden mit Wasserstoff aus dem Wasser. (Nach FLOSS und TSAI, 1979)

Abb. 45

Da in dieses Nachweisverfahren nur chirale Essigsäure eingesetzt werden kann, ist eine Isolierung der zu analysierenden Methylgruppe aus dem Produkt der untersuchten Enzymreaktion notwendig. Voraussetzung ist natürlich, daß ein solcher Abbau die Konfiguration der Methylgruppe nicht, oder in bekannter Weise verändert.

Die mit Hilfe der 6-O-Methyltransferase aus Berberis Zellkulturen übertragene Methylgruppe in die 6-OH-Stellung von Reticulin (s.S. 159 ff) und die 2-Methoxygruppe des aus Ber-

beris Zellkulturen isolierten Jatrorrhizins (s.S. 166) werden nach einem Verfahren von WOODARD et al. (1980b) mit Cer(IV)Ammoniumnitrat oxidativ zu Methanol abgebaut. Bei dieser Reaktion wird die Bindung zwischen dem Sauerstoff und dem Kohlenstoff des Alkaloidgerüsts gespalten, so daß die Methoxygruppe als Einheit abgespalten wird, und die Konfiguration der Methylgruppe erhalten bleibt. Der chirale Methanol wird in 3,5-Dinitrobenzoesäureester überführt. Dieser Ester wird mit CN^- zu Acetonitril umgesetzt. Diese Reaktion verläuft mit Inversion, so daß sich die Konfiguration der Methylgruppe bei dieser Reaktion umkehrt. Das Acetonitril wird weiter zu Essigsäure umgesetzt.

Die durch N-Methyltransferase aus Berberis Zellkulturen übertragene N-Methylgruppe von Reticulin (s.S. 159 ff) wird nach einem Verfahren von WOODARD et al. (1980a) mit KMnO_4 oxidativ als Methylamin aus dem Alkaloidgerüst abgespalten. Der Stickstoff des Amins wird mit Tosylchlorid in zwei Schritten derivatisiert. Dieses Ditosyl-Derivat wird mit CN^- ebenfalls unter Inversion zu Acetonitril umgesetzt, wobei sich die Konfiguration der Methylgruppe umkehrt.

Beide Abbauewege führen also bei der Essigsäurebildung zu einer Umkehr der Konfiguration der Methylgruppe. Die Essigsäure wird enzymatisch zu Acetyl-CoA umgesetzt, und in die Chiralitätsuntersuchung eingesetzt.

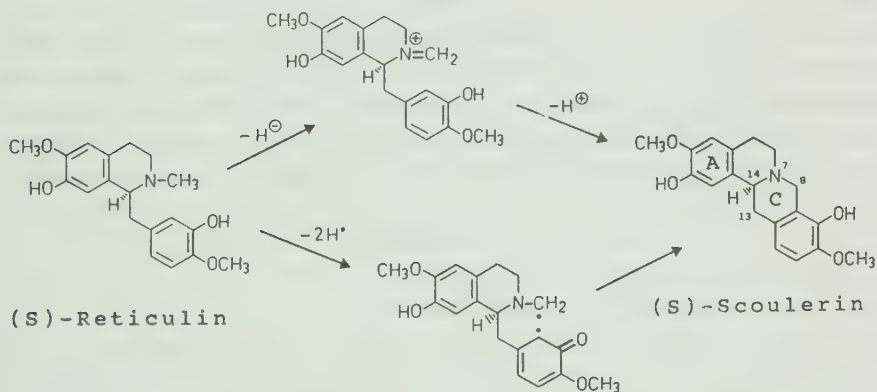
6.3 Darstellung möglicher Mechanismen des Berberinbrücken-Enzyms und der Berberin Synthase

Interessant im Zusammenhang mit den aufeinanderfolgenden Reaktionen von Berberinbrücken-Enzym und S-Tetrahydroprotoberberin Oxidase sowie von Berberin Synthase und der Öffnung der Methylenedioxybrücke, ist das stereochemische Schicksal der beiden, in diese Reaktionen einbezogenen Methylgruppen des Reticulins. Eine Untersuchung der Konfigurationsänderung dieser chiral markierten Methylgruppen im Verlauf dieser Reaktionen kann zu einer Erklärung des Reaktionstyps beitra-

gen.

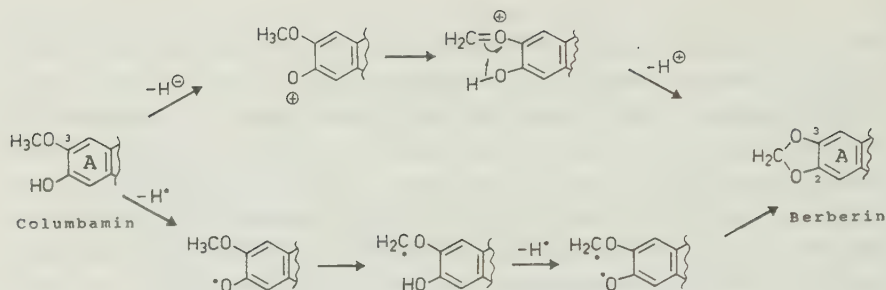
Für die Ausbildung der Berberinbrücke durch das Berberinbrücken-Enzym werden zwei mögliche Mechanismen diskutiert. Ein ionischer, der über ein Methylen-Iminium Intermediat verlaufen könnte, das nach Abspaltung eines H^+ von der N-Methylgruppe von Reticulin entsteht, und ein radikalischer Mechanismus, mit einem Diradikal als Zwischenstufe, das nach der Abspaltung zweier Wasserstoffradikale von der N-Methylgruppe und der 2'-Position im Benzylring von Reticulin entsteht (STEFFENS, 1984). Für die anschließende Aromatisierung des neu entstandenen Ringes C des Scoulerins durch STOX ist von AMANN (1986) die Dehydrierung der C-14 - N Bindung als erster Schritt nachgewiesen worden, dem die Ausbildung eines aromatischen Systems möglicherweise spontan, ohne enzymatische Katalyse folgen kann.

Die andere Reaktionssequenz betrifft die Ausbildung der 2,3-Methylenedioxybrücke des Berberins. Wie für die Bildung der Methylengruppe der Berberinbrücke, sind auch hier ein ioni-



Darstellung der möglichen ionischen und radikalischen Zwischenstufen der Berberinbrücken Enzym-Reaktion. (Nach BARTON et al., 1963b,c; BATTERSBY, 1963)

Abb. 46



Mögliche Reaktionsabläufe zur Bildung der 2,3-Methylenedioxybrücke im Berberin. Unten der Weg über ein Diradikal, oben ein ionischer Mechanismus. (Nach BARTON et al., 1963a)

Abb. 47

scher und radikalischer Mechanismus vorstellbar. BARTON et al. (1963a) halten aber den ionischen für wahrscheinlicher, da sich das Radikal besser stabilisieren kann als das ionische Zwischenprodukt, das dadurch leichter zum Ringschluß führen könnte. Die Öffnung der Methylenedioxybrücke zur 2-Methoxygruppe von Jatrorrhizin ist durch Fütterungsexperimente mit Berberis Zellkulturen (BEECHER und KELLEHER, 1983; RÜFFER et al., 1983b) eindeutig belegt, der Nachweis des Enzyms, das diesen Schritt katalysiert, steht jedoch noch aus.

6.4 Bestimmung der Konfiguration der chiral markierten Methylen- thylengruppen in Scoulerin und Berberin

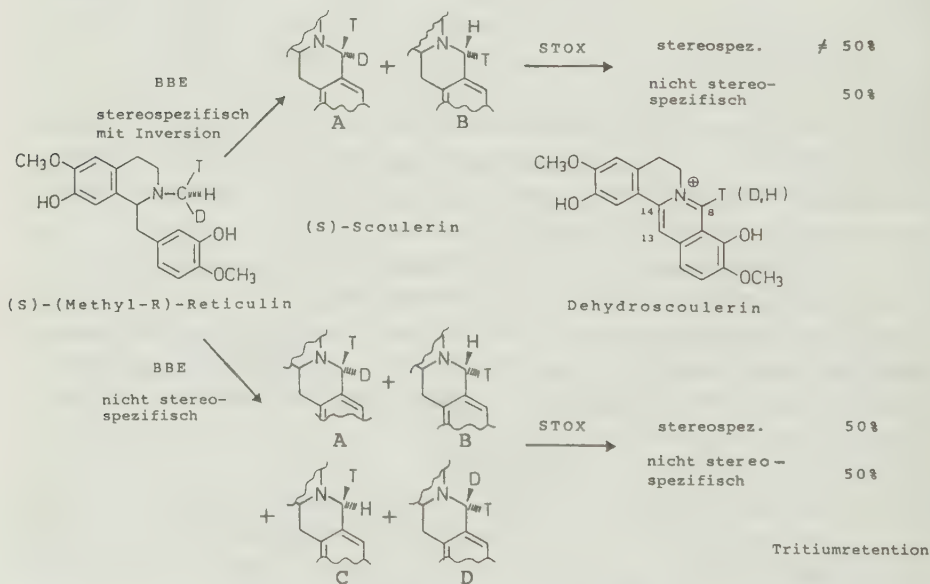
Je nachdem, ob die Bildung der Methylenbrücke stereospezifisch erfolgt oder nicht, kommt es in Abhängigkeit eines Isotopeneffektes zu einer unsymmetrischen, bzw. zu einer gleichförmigen Verteilung des Tritiums in die pro-R und pro-S Stellung, mit einem jeweils genau definierten oder einem beliebigen Partner in der jeweils anderen Methylenwasserstoffposition.

Entscheidend ist es nun, diesen Unterschied in der Verteilung der Isotope in der Methylengruppe eindeutig zu analysieren. Eine Möglichkeit besteht, wie für die Methylgruppen bereits dargestellt, im chemischen Abbau der Methylengruppe zu Essigsäure, deren Methylgruppe einer Chiralitätsuntersuchung unterzogen wird, und so Rückschlüsse auf die chiralen Verhältnisse in der ursprünglichen Methylengruppe ermöglicht. Für die beiden Methylengruppen des Berberins sind Abbauewege, die ihre Chiralität nicht, oder in bekannter Weise verändern, allerdings nicht bekannt.

Für die 2,3-Methylenedioxybrücke bietet sich jedoch ein enzymatisches Verfahren an. Das entstandene Berberin kann in vivo mit Berberis Kalluskulturen zu Jatrorrhizin umgesetzt werden, und anschließend die aus der Methylenedioxybrücke entstandene 2-Methoxygruppe, nach Abbau zu Essigsäure, analysiert werden. Dieses Verfahren stellt also einen enzymatischen Abbau der Methylengruppe dar. Der Nachteil liegt darin, daß der sterische Verlauf dieses Abbaus nicht bekannt ist, und deshalb die Ergebnisse unter Umständen, z.B. wenn die 2-Methoxygruppe razemisch sein sollte, keine eindeutige Aussage zu den beiden Einzelreaktionen zulassen.

Die zweite Möglichkeit besteht darin, das Produkt der enzymatischen Reaktion, Scoulerin bzw. Berberin, mit ^3H -NMR zu untersuchen. Das kann nur erfolgreich sein, wenn die pro-R und pro-S Protonen der Methylengruppe unterscheidbare Signale geben, die zudem sicher zugeordnet sein müssen. Für die Methylenedioxygruppe im Berberin ist das nicht möglich, da

beide Protonen ein einziges Signal ergeben (die pro-R und pro-S Stellung sind nur enantiotop und nicht diastereotop (FLOSS und TSAI, 1979)). Für C-8 der Berberinbrücke dagegen, sind beide Voraussetzungen gegeben (FLOSS pers. Mitteilung). Für eine NMR-spektroskopische Untersuchung sind allerdings beträchtlich höhere Mengen an chiral markiertem Produkt notwendig, als für die enzymatische Analytik, wie sie für die Methylgruppen beschrieben worden ist, etwa 0,1 bis 1 mCi ^3H . Als dritte Möglichkeit bietet sich, zumindest für die Berberinbrücke, eine enzymatische Analyse an. Unter gewissen Voraussetzungen wäre eine Analyse nach den selben Prinzi-



Darstellung der Untersuchung zum Reaktionsverlauf des Berberinbrücken-Enzyms (BBE) und der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX). Nur in dem Fall, daß beide Reaktionen stereospezifisch verlaufen, kann die Retention des in Scoulerin enthaltenen Tritium größer oder kleiner 50 % sein. Dabei muß sie für eine R-konfigurierte Methylgruppe um den selben Betrag von 50 % abweichen wie die der S-konfigurierten Methylgruppe. Nur die Vorzeichen der Abweichung sind unterschiedlich.

Abb. 48

prien möglich, nach denen chirale Essigsäure mit dem Malat Synthase/Fumarase System untersucht wird. Der stereochemische Verlauf der Methylengruppenbildung der Berberinbrücke (entspricht der Malat Synthase Reaktion) kann dann durch Dehydrierung mit STOX detektiert werden (entspricht der Fumarase Reaktion), wenn die BBE-Reaktion einen Isotopeneffekt aufweist, und die Oxidase stereospezifisch bezüglich der Abspaltung eines Wasserstoffes an C-8 reagiert. Die erste Bedingung ist sicher erfüllt (STEFFENS, 1984), die zweite nicht, falls die Aromatisierung des Ringes C von Scoulerin nichtenzymatisch verläuft, wie oben bereits angedeutet worden ist. Eine Untersuchung zum sterischen Verlauf der ebenfalls von S-Tetrahydroprotoberberin Oxidase katalysierten Dehydrierung, von stereospezifisch an dem, C-8 gegenüberliegenden C-13 markiertem Canadin zu Berberin, untermauert diese Vermutung. Das Tritium in der pro-R und pro-S Stellung von C-13 werden gleichermaßen abgespalten (BATTERSBY, 1975).

Im Fall der 2,3-Methylenedioxybrücke im Berberin ist eine vergleichbare Vorgehensweise nicht möglich, da keine weitere Abspaltung von Wasserstoff möglich ist.

6.5 Synthese von (Methyl-R) und (Methyl-S) SAM

Für die Untersuchung der oben angesprochenen Reaktionen müssen zuerst die chiralen Methylgruppen von SAM, das aus dem, von dem Arbeitskreis von Prof. Floss erhaltenen chiralen Methionin hergestellt wird, auf Reticulin übertragen werden.

Die Synthese des entsprechend chiral markierten SAM erfolgt nach der selben Methode, wie sie für einfach radioaktiv markiertes SAM angegeben worden ist (s.S. 48). Die Zusammensetzung der Ansätze ist in Tabelle 21 angegeben.

Die Ansätze werden 3 Stunden bei 20°C inkubiert, bis kein weiterer Umsatz festzustellen ist (DC, Laufmittel 1 und 2). In beiden Fällen kann nach Ende der Reaktion 98% der einge-

	Methyl-R		Methyl-S	
Chirales Methionin	62 μ Ci	0,62 μ mol	212 μ Ci	1,3 μ mol
ATP	3,8 mM	25 μ mol	3,8 mM	25 μ mol
KCl	30 mM		30 mM	
MgCl ₂	50 mM		50 mM	
Tris/HCl	20 mM	pH 7,5	20 mM	pH 7,5
CPG-10 immobilisierte SAM-Synthetase	300 pkat		300 pkat	
Volumen	6,5 ml		6,5 ml	
spez. Radioaktivität	100 mCi/mmol		160 mCi/mmol	
Enantiomeren-Überschuß ee	91 %		86 %	
radiochemische Reinheit				
Methionin	66 %		83 %	
SAM	60 %		70 %	

Tabelle 21

Zusammensetzung der Syntheseansätze für (Methyl-R)- und (Methyl-S)-SAM. Die Enantiomeren Reinheit ee von Methionin und SAM ist nicht bestimmt worden. Der angegebene Wert ist mit der direkten Synthesevorstufe Methylamin bestimmt worden. Die radiochemische Reinheit ist mit DC in Laufmittel 1 und 2 bestimmt worden.

setzten Radioaktivität aus dem Syntheseansatz zurückgewonnen werden. Trotz der offenbar erheblichen Verunreinigungen durch unbekannte Zersetzungsprodukte werden die SAM-Präparationen nicht weiter gereinigt, weil in den folgenden Methyltransferase Reaktionen diese Verunreinigungen nicht stören. Die radiochemische und stereochemische Reinheit sind in der Übersicht der Reaktionsansätze angegeben. Da die Reaktion der SAM-Synthetase keine Bindungen der Methylgruppe berührt, bleibt ihre Konfiguration unverändert.

Die stereochemische Reinheit des verwendeten Methionins und des gebildeten SAM ist nicht bestimmt, sondern von der direkten Synthesevorstufe Methylamin übernommen worden (FLOSS, pers. Mitteilung).

6.6 Enzymatische Synthese von Reticulin, das mit chiralen Methylgruppen markiert ist

Für die Untersuchungen zur Bildung der Berberin- und Methylendioxybrücke von Berberin, ist Reticulin mit chiral markierten Methylgruppen in der 6-O-Stellung und am Stickstoff als Vorstufe notwendig. Zu deren Herstellung werden die vorher beschriebenen 6-O-Methyltransferase und N-Methyltransferase aus B. koetianeana verwendet.

In einem Vorversuch muß zuerst die Auswirkung der Methylgruppenübertragung auf die Konfiguration der Methylgruppe untersucht werden. Von den meisten bisher in dieser Hinsicht untersuchten Methyltransferasen (WOODARD et al., 1980b) wird die Konfiguration der Methylgruppe bei der Übertragung umgekehrt. Dies wird als ein Zeichen für die direkte Übertragung der Methylgruppe von SAM auf den Akzeptor über einen S_N2 -Mechanismus interpretiert. Ob dies auch für diese Enzyme des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels zutrifft, soll an Hand einer Chiralitätsuntersuchung der 6-O-Methyl und N-Methylgruppe von Reticulin gezeigt werden. Die genaue Kenntnis der Konfiguration dieser Methylgruppen ist für die weiteren Untersuchungen notwendige Voraussetzung.

Die Synthesen werden genau wie jene mit einfacher radioaktiver Markierung durchgeführt (s.S. 141). Es werden grundsätzlich für jedes Substrat die beiden enantiomeren Methylgruppen eingesetzt, um für die Analytik eine geeignete Kontrollmöglichkeit zu haben. Die Zusammensetzung der Ansätze und die Ausbeuten an markiertem Reticulin sind in Tabelle 22 angegeben. Die Identität der Syntheseprodukte als Reticulin wird durch Analyse mit HPLC-System C und bei (S)-Konfiguration an C-1, durch Umsetzung mit Berberinbrücken-Enzym zu Scoulerin (s.S. 126) bestätigt.

Die Produkte der Ansätze Nr. 1 bis 4,

(N-Methyl-R)- und (N-Methyl-S)-(R)-Reticulin sowie

(N,6-O-Methyl-R)- und (N,6-O-Methyl-S)-(S)-Reticulin,

werden für die Konfigurationsuntersuchung der Methylgruppe

Nr.	Produkt	Substrat	nmol	SAM	Enzym	Volumen μl	Zeit/Temp. h / °C	Reinigung	Ausbeute % μCi
1	(R)-(N-Methyl-S)-Reticulin	(R)-Norreticulol	500	R 110 11	NMT 15	4500	3 / 37	Extraktion	68 7,5
2	(R)-(N-Methyl-R)-Reticulin	(R)-Norreticulol	500	S 202 32,3	NMT 40	6500	2 / 37	Extraktion	86 28
3	(S)-(N,6-O-Methyl-S)-Reticulin	(S)-4'-O-Methylnorlaucosolol	250	R 72 7,2	6 OMT 9/ NMT 25	550	8 / 37	DC	28 2
4	(S)-(N,6-O-Methyl-R)-Reticulin	(S)-4'-O-Methylnorlaucosolol	250	S 53 8,5	6 OMT 6/ NMT 15	940	2,5 / 37	DC	41 3,4
5	(S)-(N-Methyl-S)-Reticulin	(S)-Norreticulol	150	R 30 3	NMT 9	870	2 / 30	DC	63 1,9
6	(S)-(N-Methyl-R)-Reticulin	(S)-Norreticulol	150	S 22 3,5	NMT 8	400	3 / 30	DC	93 3,2
7	(S)-(6-O-Methyl-S)-Reticulin	(S)-4'-O-Methyl-laudosolol	1000	R 156 15,6	OMT 13	4200	6 / 37	DC	83 13
8	(S)-(6-O-Methyl-R)-Reticulin	(S)-4'-O-Methyl-laudosolol	1000	S 148 23,6	OMT 13	2340	4,5 / 37	DC	85 20

Tabelle 22

Zusammensetzung der Ansätze zur enzymatischen Synthese von Reticulin, das mit chiralen Methylgruppen markiert ist. Bei der Angabe der Konfiguration der Methylgruppe im Reticulin ist deren Umkehr bei der Übertragung der Methylgruppe berücksichtigt. Alle Ansätze enthalten zusätzlich 50 mM Hepes pH 7,5 und 10 mM Ascorbat. Für das eingesetzte SAM ist die Konfiguration der Methylgruppe angegeben. NMT und 6 OMT sind aus B. koetineana isoliert worden, OMT stammt aus Schweineleber. Die Aktivität der Enzyme ist im Standardtest ermittelt worden. Zeit und Temperatur bezeichnen die Inkubationsdauer und -temperatur. Die Art der Reinigung der Produkte ist im Text (s.S. 145) erläutert. Die Ausbeute bezieht sich auf die eingesetzte Radioaktivität.

verwendet, die der Ansatz Nr. 5 bis 8,

(N-Methyl-R)- und (N-Methyl-S)-(S)-Reticulin sowie

(6-O-Methyl-R)- und (6-O-Methyl-S)-(S)-Reticulin

für die Untersuchungen der Methylengruppen.

Für die Markierung der 6-O-Stellung mit 6-O-Methyltransferase kann nicht das bereits N-methylierte Substrat 4'-O-Methylaudanosolin verwendet werden, da es von dem Enzym nicht umgesetzt wird (s.S. 92). In den Ansätzen Nr.3 und 4 wird deshalb die entsprechende Norverbindung und zusätzlich N-Methyltransferase eingesetzt. Dadurch kommt es zu einer zweifachen Markierung in der 6-O-Stellung und am Stickstoff von Reticulin. Die geringen Ausbeuten bei diesen Ansätzen sind darauf zurückzuführen, daß auch (S)-4'-O-Methylnoraudanosolin von dem Enzym nur langsam umgesetzt wird und darauf, daß die N-Methylierung nicht vollständig abläuft, und das gebildete (6-O-Methyl-R)- und (6-O-Methyl-S)-(S)-Norreticulin bei der Aufarbeitung des Ansatzes mit DC in Laufmittel 3 zersetzt wird (s.S. 145).

Da für die Untersuchungen der Methylendioxybrücke größere Mengen an 6-O-Methyl-markiertem Substrat benötigt werden, als für die Chiralitätsuntersuchung der 6-O-Methylgruppe, werden diese Synthesen (Ansatz 7 und 8, Tab 22) mit Catechol-O-Methyltransferase aus Schweineleber durchgeführt, die auch mit dem bereits N-methylierten Substrat reagiert, wodurch der Verbrauch an chiralem SAM halbiert wird und deutlich bessere Ausbeuten erzielt werden. Der sterische Verlauf der COMT ist bekannt (WOODARD et al., 1980b); die Konfiguration der Methylgruppe wird bei der Übertragung umgekehrt.

6.7 Bestimmung der Konfiguration der durch 6 OMT und NMT aus B. koetianeana übertragenen Methylgruppen

Das chiral markierte Reticulin der Syntheseansätze Nr. 1 bis 4 (Tab. 22) wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Floss abgebaut, wobei die 6-O- und N-Methylgruppen in Essigsäure überführt werden. Dabei wird in einem Schritt die Konfigura-

tion der Methylgruppe umgekehrt (WOODARD et al., 1980a,b). Es gelingt auch die Doppelmarkierung aus (N,6-O-Methyl-R/S)-(S)-Reticulin (Ansatz Nr. 3,4, Tab. 22) getrennt zu isolieren und zu analysieren, wobei zuerst die 6-O-Methylgruppe mit Cer(IV)Ammoniumnitrat oxidativ abgespalten wird, und aus dem entstandenen Chinon die N-Methylgruppe durch Oxidation mit KMnO_4 erhalten wird (s.S. 151). Die Chiralitätsuntersuchung der Essigsäure ergibt, für die, aus Synthesen mit (Methyl-S)-SAM hervorgegangenen Methylgruppen, sowohl aus der 6-O- wie der N-Stellung, die S-Konfiguration. Umgekehrt besitzen die, aus (Methyl-R)-SAM entstandenen Methylgruppen alle R-Konfiguration. Das bedeutet, daß die Konfiguration bei der enzymatischen Übertragung umgekehrt worden ist. (Bei dem Abbau zu Essigsäure wird sie abermals umgekehrt, und hat danach dieselbe Konfiguration wie im SAM.) Die F-Werte (s.S. 150) der Analysen mit dem Malat Synthase/Fumarase System sind in Tabelle 23 zusammengestellt.

	Synthese- Ansatz	eingesetztes SAM		N-Methyl- gruppe			6-O-Methyl- gruppe		
	Nr.	ee	Konfig.	F	ee	Konfig.	F	ee	Konfig.
(R)-(N-Methyl)- Reticulin	1	91%	R	77%	94%	S	---		
(R)-(N-Methyl)- Reticulin	2	86%	S	22%	96%	R	---		
(S)-(N,6-O-Methyl)- Reticulin	3	91%	R	77%	94%	S	76%	88%	S
(S)-(N,6-O-Methyl)- Reticulin	4	86%	S	22%	96%	R	25%	86%	R

Tabelle 23 Ergebnisse der Chiralitätsuntersuchung der von 6 OMT und NMT aus *B. koetianeana* übertragenen, chiral markierten Methylgruppen auf Reticulin. Angegeben ist der F-Wert der Analyse mit dem Malat Synthase/Fumarase System sowie die sich daraus ergebende Konfiguration der Methylgruppe und der Enantiomerenüberschuß ee.

6.8 Untersuchungen zur Bildung der 2,3-Methylendioxybrücke in Berberin

Wie schon vorher besprochen, besteht das Problem bei der Untersuchung der Bildung der 2,3-Methylendioxybrücke mit einer chiral markierten Methylgruppe, in der Schwierigkeit, die Verteilung der als Markierung dienenden Wasserstoffisotope auf die pro-R und pro-S Stellung der Methylenbrücke zu analysieren.

In vivo soll die Gesamtreaktion der Übertragung der Methylgruppe von der 3-O-Stellung des Columbamins in die 2-O-Stellung von Jatrorrhizin untersucht werden. Dazu wird eine geeignete, mit einer chiralen Methylgruppe markierte Vorstufe, an Kalluskulturen von Berberis Arten appliziert und das daraus gebildete Jatrorrhizin, das ein Hauptalkaloid dieser Kulturen darstellt, isoliert, und dessen 2-Methoxygruppe dann einer Chiralitätsuntersuchung unterzogen.

(3-O-Methyl-R/S)-Columbamin selbst, ist als Vorstufe für dieses Fütterungsexperiment nicht geeignet, weil es, auf Grund seiner positiven Ladung am Stickstoff, von den Zellen nicht aufgenommen werden wird. Daß sich Reticulin als Vorstufe für die angestrebte Umsetzung eignen könnte, geht aus Ergebnissen von Fütterungsexperimenten hervor, in denen (S)-Reticulin an B. stolonifera Kalluskulturen verfüttert wurde. 18% des eingesetzten (S)-Reticulin wurden dabei in Jatrorrhizin eingebaut (STADLER, 1986).

In einem Vorversuch werden Kalluskulturen verschiedener Berberis Arten im Hinblick auf ihre Fähigkeit untersucht, (S)-(N-C³H₃)-Reticulin in Jatrorrhizin einzubauen. Damit soll eine Kultur gefunden werden, die eine möglichst hohe Einbaurate aufweist. In dem Versuch werden Kulturen von B. stolonifera, B. koetianae, B. edgeworthiana und B. giraldii untersucht. Diese Kulturen zeichnen sich durch eine besonders intensive Gelborangefärbung aus, die einen hohen Gehalt an Protoberberin Alkaloiden andeutet.

7 Tage nachdem die Kalli auf frisches Medium übertragen worden sind, wird ihnen jeweils 5 µCi/100 nmol (S)-(N-C³H₃)-

Reticulin in 100 µl sterilem Wasser appliziert. Sie werden dann unter den normalen Kultivierungsbedingungen aufbewahrt (s.S. 15). Nach 5 Tagen werden die Kalli in 10 ml Methanol pro 1 g Frischgewicht Gewebe, mit einem Ultra Turrax (IKA) homogenisiert. Die Suspension wird durch eine Glasfritte filtriert und der Rückstand erneut in 10 ml Methanol aufgenommen und wieder abfiltriert. Die Filtrate werden vereinigt und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 5 ml 70°C heißem Methanol gelöst und durch Watte abfiltriert. Die Lösung wird zur Trockne eingengt und in 5,0 ml Methanol gelöst. In 50 µl dieses intensiv gelb gefärbten Methanolextraktes wird die Radioaktivität bestimmt. Dazu wird die Probe mit NaBH_4 reduziert, um Störungen durch die starke Fluoreszenz der oxidierten Protoberberine zu vermeiden. Der Methanolextrakt wird auf jeweils zwei DC-Kieselgelfolien aufgetragen und mit Laufmittel 4 aufgetrennt. Die rotorange Zone von Jatrorrhizin bei R_f 0,1 wird mit je 20 ml 0,2 mM Essigsäure in Methanol eluiert. Die Lösung wird zur Trockne eingengt, in 2 ml Methanol gelöst, und weiter mit DC in Laufmittel 6 gereinigt. Die orange Bande von Jatrorrhizin bei R_f 0,3 wird wieder mit 20 ml 0,2 mM Essigsäure in Methanol

Kultur	FG	TG	MeOH Extr.	DC-gereinigtes (C-8- ^3H)-Jatrorrhizin			
				Einbau		spez. Aktiv.	
	g	g	µCi	µCi	%	µmol	µCi/µmol
B. koetianeana	2,3	0,11	1,95	0,60	36	4,3	0,14
B. edgeworthiana	2,5	0,13	1,96	0,52	31	5,8	0,09
B. giraldii	2,3	0,10	1,15	0,32	19	6,2	0,05
B. stolonifera	2,0	0,10	1,40	0,26	16	4,2	0,06

Tabelle 24 Applikation von 5 µCi/100 nmol (S)-(N- C^3H_3)-Reticulin an Kalluskulturen verschiedener Berberis Arten. Angegeben ist die gesamte, mit Methanol extrahierbare Radioaktivität, 5 Tagen nach Versuchsbeginn, und die nach dünnschichtchromatografischer Reinigung in Jatrorrhizin vorliegenden Radioaktivität. Die Einbaureate berücksichtigt den Verlust von 2/3 der Radioaktivität im Verlauf der Biosynthese, und bezieht sich auf das eingesetzte Reticulin. Der Jatrorrhizin Gehalt wird photometrisch bestimmt.

nol eluiert. Das Lösungsmittel wird abgetrennt, und der Rückstand in 2,0 ml Methanol gelöst. In 20 µl dieser Lösung wird die Radioaktivität bestimmt. Bei der Bestimmung der Einbaurate von (S)-(N-C³H₃)-Reticulin in Jatrorrhizin muß der Verlust von 2/3 der Radioaktivität bei der Bildung der Berberinbrücke und deren Dehydrierung berücksichtigt werden. Die Ergebnisse, die mit den verschiedenen Berberis Arten erzielt worden sind, sind in Tabelle 24 angegeben.

Mit B. koetineana wird das beste Einbauergebnis erzielt. Mit 36%, bezogen auf das eingesetzte Reticulin, liegt der Einbau in Jatrorrhizin um das Doppelte über dem, von STADLER (1986), und auch dem in diesem Versuch ermittelten Wert mit B. stolonifera Kalluskulturen.

Ziel der Reinigungsprozedur von Jatrorrhizin ist es, Columbamin, das die Chiralitätsuntersuchung der 2-Methoxygruppe von Jatrorrhizin stören würde, restlos abzutrennen. Die Reinheit des isolierten Jatrorrhizins wird mit HPLC System D nachgewiesen. Die gereinigten Extrakte aller 4 Berberis Arten zeigen nur einen einzigen Peak nach der für Jatrorrhizin üblichen Retentionszeit von 16,6 Minuten. Columbamin wird nicht detektiert.

Von allen gereinigten Methanolextrakten werden UV-Spektren in Methanol im Sauren (0,2 mM Essigsäure) und im Alkalischen (0,2 mM NaOH) aufgenommen. Sie entsprechen exakt denen einer authentischen Referenz.

Im Sauren ist Jatrorrhizin gelb (molarer Extinktionskoeffizient ($10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$)):

Die Maxima liegen bei 265 nm (22,8), 349 nm (25,4) und 430 nm (5,3); die Minima bei 302 nm (6,5) und 380 nm (2,3).

Im Alkalischen ist Jatrorrhizin rot gefärbt: Maxima bei 248 nm (24,5), 388 nm (31,6) und 485 nm (3,8); Minima bei 318 nm (4,3) und 442 nm (3,0).

Der Gehalt von Jatrorrhizin wird photometrisch im Sauren bei 349 nm gemessen ($E_{349} = 25,4$ für eine 1 mM Lösung).

Für die Fütterung von 13 $\mu\text{Ci}/130 \text{ nmol}$ chiral markiertem (S)-(6-O-Methyl-R)- (88% ee) und 20 $\mu\text{Ci}/125 \text{ nmol}$ (S)-(6-O-Methyl-S)-Reticulin (86% ee) (aus den Synthesansätzen 7,8; Tab. 22) werden Kalli von B. koetineaana verwendet.

Die eingesetzten Mengen dieser chiral markierten Substrate werden auf jeweils zwei Kalli verteilt. Die Isolierung und Reinigung von Jatrorrhizin in diesem Versuch erfolgt, wie im Vorversuch, 5 Tage nach der Applikation. Die Kalli haben, anders als im Vorversuch, in dieser Zeit ihre gelbe Farbe verloren, und sind braun geworden. Ein Zeichen dafür, daß sie möglicherweise infiziert, oder durch Kieselgel, das mit den Substraten eingeschleppt worden ist, geschädigt worden sind.

(S)-(6-O-Methyl-R)-Reticulin: 7,0 g (FG), 0,33 g (TG) Kallusgewebe werden extrahiert. 0,44 $\mu\text{Ci}/12,4 \mu\text{mol}$ Jatrorrhizin können gewonnen werden. Wird berücksichtigt, daß bei der Bildung der Methylenedioxybrücke 1/3 der Radioaktivität ausgebaut werden kann (abhängig von einem möglichen intramolekularen Isotopeneffekt der Berberin Synthese), so sind nur 3,3% des eingesetzten Reticulins in Jatrorrhizin eingebaut worden.

(S)-(6-O-Methyl-S)-Reticulin: 5,4 g (FG), 0,26 g (TG) Kallusgewebe werden extrahiert. 0,66 $\mu\text{Ci}/13,0 \mu\text{mol}$ Jatrorrhizin werden daraus gewonnen. Das bedeutet einen Einbau von 7,6% des eingesetzten Reticulins.

Dieser, gegenüber dem Vorversuch so geringe Einbau ist wohl auf die Schädigung der Kalli während der Fütterung zurückzuführen.

Das isolierte Jatrorrhizin wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Floss abgebaut (s.S. 151) und die aus der 2-Methoxygruppe gewonnene Essigsäure in die Chiralitätsanalyse eingesetzt (KOBAYASHI et al., 1987).

Die 2-Methoxygruppe von Jatrorrhizin aus der (S)-(6-O-Methyl-S)-Reticulin-Fütterung liefert einen F-Wert von 55,4%. Das bedeutet, daß sie S-Konfiguration besitzt, aber mit einem Enantiomeren Überschuß von nur 19% ee.

Die 2-Methoxygruppe, die aus (S)-(6-O-Methyl-R)-Reticulin

hervorgegangen ist, liefert einen F-Wert von 44,2%. Diese Methylgruppe besitzt also R-Konfiguration mit einem Enantiomeren Überschuß von 20% ee.

Die Übertragung der Methylgruppe in der Sequenz (2-OCH₃)-Columbamin - (2,3-OCH₂O)-Berberin - (3-OCH₃)-Jatrorrhizin erfolgt also unter Netto-Retention ihrer Konfiguration, aber gleichzeitig wird ein erheblich höherer Anteil razemisiert, als es theoretisch zu erwarten wäre. Ohne Berücksichtigung eines Isotopeneffektes der Berberin Synthase, dessen Wert nicht bekannt ist, enthält die 2,3-Methylenedioxybrücke zu gleichen Teilen die Kombinationen ³H und ²H, sowie ³H und ¹H. Bei der Öffnung der Methylenbrücke liefert die Kombination ³H-²H chirale Methylgruppen, die Kombination ³H-¹H achirale, da ein weiteres ¹H aufgenommen wird. Demnach wäre eine Enantiomeren Reinheit von genau der Hälfte des Ausgangsmaterials zu erwarten gewesen, also 44% und 43 % ee, wenn die beiden Reaktionen stereospezifisch verlaufen, und nicht die gefundenen 19% und 20% ee.

6.9 Untersuchungen zur Bildung der Berberinbrücke

Die Bildung der Berberinbrücke soll mit enzymkinetischen Methoden untersucht werden, wie es vorher bereits beschrieben worden ist (s.S. 154). Der Umsatz von (S)-(N-Methyl-R)- und (S)-(N-Methyl-S)-Reticulin mit Berberinbrücken-Enzym aus Corydalis vaginans (s.S. 125), das frei von S-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX) ist, wird durch Bestimmung des Tritiumausbaus kinetisch verfolgt. Nach vollständigem Ablauf dieser Reaktion wird dem Testansatz S-Tetrahydroprotoberberin Oxidase zugesetzt und der weitere Ausbau von Tritium verfolgt, bis auch diese Reaktion ihren Endpunkt erreicht hat.

Jeder Ansatz enthält in 800 µl Volumen 25 mM Glycin/NaOH pH 9,2, 0,25 pkat Berberinbrücken Enzym (Aktivität im Standardtest ermittelt) und jeweils 4,2 nmol (5,3 µM) (S)-(N-Methyl-R)- (0,67 µCi, 96% ee) und (S)-(N-Methyl-S)-Reticulin (0,42 µCi, 94% ee) (Syntheseansätze Nr. 5,6; Tab.22). Nach

festgelegten Zeitabständen werden den Ansätzen 50 μ l entnommen und die Reaktion durch Zusatz von 300 μ l Kohlesuspension (4g/100ml) abgestoppt. Der Tritiumausbau wird, wie für den Standardtest angegeben, bestimmt.

Nach 120 Minuten werden 50 μ l der beiden Testansätze mit DC in Laufmittel 3 aufgetrennt, um zu zeigen, daß Reticulin in beiden Ansätzen vollständig zu Scoulerin umgesetzt worden ist.

Beiden Ansätzen wird anschließend 5 pkat STOX in 12 μ l zugesetzt, und wiederum in Zeitabständen 51 μ l entnommen, die auf ihre Tritiumfreisetzung hin analysiert werden. Nach drei Stunden werden 50 μ l der Ansätze mit DC in Laufmittel 6 aufgetrennt. Die Radioaktivität liegt jetzt ausschließlich auf Höhe von Dehydroscoulerin (R_f 0,5), Scoulerin ist vollständig umgesetzt worden.

Der Verlauf der Tritiumfreisetzung ist in Abb. 49 dargestellt.

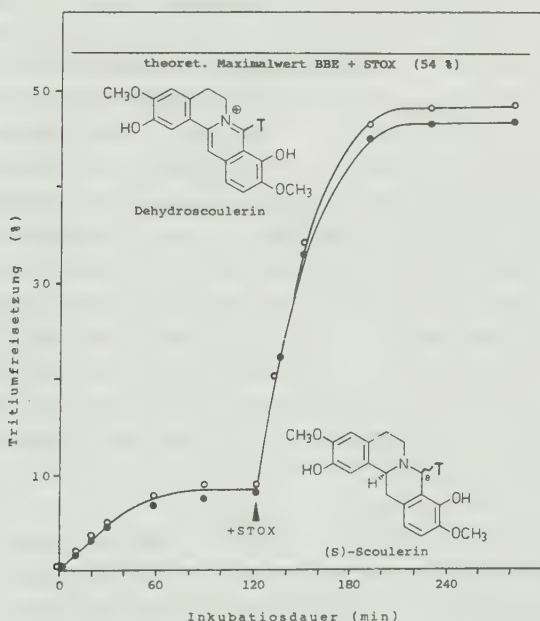
In der Berberinbrücken-Enzym-Reaktion kommt es, auf Grund eines intramolekularen Isotopeneffektes, zu einer deutlichen Retention von Tritium. Nur 8% (Methyl-R) und 9% (Methyl-S) der eingesetzten Menge Tritium (das sind 24% bzw. 27% der theoretisch möglichen Menge) wird aus Reticulin freigesetzt. Das bedeutet, daß die C-H bzw. C-D Bindungen der Methylgruppe etwa 4 mal schneller gespalten werden, als die C-T Bindung.

Im Scoulerin verbleiben nach der Berberinbrücken-Enzym-Reaktion 91% der eingesetzten Menge Tritium. In der nachfolgenden Reaktion der S-Tetrahydroprotoberberin Oxidase kann davon die Hälfte freigesetzt werden. Zusammen mit der vom Berberinbrücken-Enzym bereits freigesetzten Tritium kann deshalb als Maximalwert 54,5% des eingesetzten Tritiums in der wässrigen Phase gemessen werden ($9\% + 91\%/2$).

Aus dem aus (S)-(N-Methyl-R)-Reticulin stammenden Scoulerin werden mit der Oxidase 37% des eingesetzten Tritium ausgebaut, und aus dem aus (S)-(N-Methyl-S)-Reticulin stammenden Scoulerin 39%, also etwas weniger als theoretisch möglich (45%). Im Rahmen der Meßgenauigkeit ist kein Unterschied

zwischen den Reaktionen der beiden enantiomeren Methylgruppen festzustellen.

Aus diesen Ergebnissen kann kein Rückschluß auf den sterischen Verlauf einer der beiden enzymatischen Reaktionen gezogen werden, nachdem sich zwischen den beiden aus enantiomeren Methylgruppen gebildeten Berberinbrücken keine Unterschiede bei der Tritiumfreisetzung ergeben.



Kinetische Untersuchung der Berberinbrücken Bildung und ihrer Dehydrierung mit Berberinbrücken-Enzym (BBE) und S-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX). Die beiden Ansätze enthalten 4,2 nmol (S)-(N-Methyl-R)- (0,67 μ Ci) $\bullet$ — $\bullet$ und (S)-(N-Methyl-S)-Reticulin (0,42 μ Ci) $\circ$ — $\circ$ und 0,25 pkat Berberinbrücken-Enzym. Nach den angegebenen Zeiten werden Anteile der Ansätze auf ihre Tritiumfreisetzung hin analysiert. Nach vollständigem Ablauf der durch Berberinbrücken-Enzym katalysierten Reaktion werden 5 pkat STOX zugesetzt, und der Tritiumausbau weiter verfolgt, bis die Dehydrierung vollständig abgelaufen ist. Der maximal erreichbare Wert beträgt 54 % Tritiumausbau (s.Text).

Abb. 49

IV. Diskussion

Die Biosynthese der Benzylisochinolin- und Protoberberin-Alkaloide ist in den letzten drei Jahrzehnten mit Hilfe von Fütterungsexperimenten mit radioaktiv markierten Vorstufen eingehend untersucht worden (u.a. BATTRESBY et al., 1965; GUPTA und SPENSER, (1965); HOLLAND et al., 1979; BEECHER und KELLEHER, 1983). Aber erst in jüngster Vergangenheit konnten die genauen Abläufe bei der Bildung dieser Alkaloide durch die Untersuchung der an ihrer Biosynthese beteiligten Enzyme aufgezeigt werden (ZENK, 1985). Dabei konnten die Prinzipien aus den vorangegangenen Fütterungsversuchen bestätigt werden, einige Unklarheiten, etwa über die wahre Natur des Precursors der Benzylhälfte der Alkaloide, endgültig entschieden werden. Den Grundstein für den Erfolg dieser enzymatischen Untersuchungen stellt wohl vor allem die Verwendung von pflanzlichen Zellkulturen als Quelle für die Isolierung der Enzyme dar. Sie ermöglichen die Arbeit mit einem unter gut reproduzierbaren Bedingungen schnell heranwachsenden, homogenen und, wie im Fall der verwendeten Kulturen verschiedener Berberis Arten, auch besonders stoffwechselaktiven Ausgangsmaterial.

In insgesamt 8 bzw. 9 Schritten wird das Berberin, von den einfachen Vorstufen Dopamin und einem entsprechend hydroxylierten Phenylacetaldehyd ausgehend, aufgebaut.

Die Methylgruppen des zentralen Metaboliten Reticulin werden von drei verschiedenen Enzymen übertragen, von denen die 6-O-Methyltransferase aus Argemone platycera (Papaveraceae) und eine N-Methyltransferase aus Berberis vulgaris (Berberidaceae) bereits untersucht worden sind (RÜFFER et al., 1983a; WAT et al., 1986). Die bislang noch nicht beschriebene 4'-O-Methyltransferase ist im Rahmen dieser Arbeit aus dem Gewebe von Berberis koetianeana Zellkulturen erstmals isoliert, gereinigt und charakterisiert worden.

Zur Reinigung dieser 4'-O-Methyltransferase wurden fünf säulenchromatographische Schritte durchgeführt, von denen die Affinitätschromatographie an immobilisiertem S-Adenosylhomocystein (SAH), einem potenten Hemmstoff von Methyltransferasen mit hoher Affinität zu diesen Enzymen, den besten Reinigungserfolg ergab. Trotz einer 400-fachen Anreicherung der 4'-O-Methyltransferase, ist es dennoch nicht gelungen eine homogene Enzympräparation zu erhalten. Zwei durch SDS-Gelelektrophorese unterscheidbare Proteine wurden gemeinsam angereichert, während anderes Fremdprotein praktisch vollständig abgetrennt wurde. Diese beiden Proteine ließen sich mit keiner der üblichen Proteinreinigungsmethoden in nativem Zustand voneinander trennen.

Daß es sich bei den beiden Proteinen nicht um Untereinheiten eines größeren Proteins handelt, geht daraus hervor, daß die SDS-gelelektrophoretisch bestimmten Molekulargewichte der beiden Proteine mit 39 und 41 kD sich zu wenig von dem mit Gelfiltration bestimmten Molekulargewicht der nativen Proteine von 51 kD unterscheiden.

Zusammen mit diesen beiden Proteinen wurden auch zwei Enzymaktivitäten parallel angereichert. Außer der 4'-O-Methyltransferase befand sich immer auch eine 6-O-Methyltransferase-Aktivität in den Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte. Schon die Tatsache, daß die beiden SDS-gelelektrophoretisch unterscheidbaren Proteine eine hohe Affinität zu dem in dem Reinigungsgang verwendeten SAH-Affinitätsmedium aufwiesen, ließ die Annahme zu, daß es sich in beiden Fällen um Methyltransferasen handeln muß. Das Verhältnis der beiden spezifischen Aktivitäten blieb im Verlauf der Reinigung nahezu unverändert. Dies wäre ein Hinweis darauf, daß ein und dasselbe Protein beide Reaktionen katalysiert, also ein nicht regiospezifisches Verhalten der 4'-O-Methyltransferase vorliegt. In diesem Fall müßte man sich vorstellen, daß das Substratmolekül auch nach einer Drehung im Raum um 180° von der aktiven Stelle des Enzyms gebunden wird, damit die der 4'-OH-Gruppe im Substrat diametral gegenüberliegende 6-OH-Gruppe mit SAM in Wechselwirkung treten kann. Die asymmetri-

sche Lage des chiralen Zentrums C-1 und des Stickstoffs im Benzylochinolin Gerüst, die auf Grund ihrer räumlichen Struktur bzw. ihrer Ladung wesentlichen Einfluß auf die Interaktion Enzym-Substrat ausüben, dürften dies aber kaum zulassen.

Als Erklärung für das gemeinsame Auftreten der beiden Enzymaktivitäten wäre es auch denkbar, daß sich zwei getrennte aktive Zentren auf einem Protein befinden. Sowohl aus Pflanzen (KOSHIBA, 1978) als auch aus Mikroorganismen (LAMBERT und COGGINS, 1985) sind Enzymaktivitäten des Shikimisäureweges bekannt (3-Dehydrochinat-Hydrolase und Shikimat: NADP⁺ Oxidoreduktase), die auf einem einzigen Proteinmolekül lokalisiert sind. Diese Enzyme liegen in einer Synthesesequenz direkt hintereinander, was auch für die beiden Methyltransferasen der Reticulinbiosynthese angenommen wird. Durch die räumliche Nähe der nacheinander ablaufenden Schritte kann einerseits verhindert werden, daß das Produkt der vorangegangenen Reaktion in andere Stoffwechselwege abwandert, und andererseits die Syntheseleistung des ganzen Systems gesteigert werden (POLLEY, 1978). Ein derartiger Aufbau des Enzyms kann allerdings für die 4'- und 6-O-Methyltransferasen ausgeschlossen werden, nachdem beide Aktivitäten bei der Untersuchung ihrer Stabilität unterschiedliche Haltbarkeit bei -20°C gezeigt haben. Während die 4'-O-Methyltransferase noch nach einem Jahr bei diesen Lagerungsbedingungen nahezu unverändert aktiv war, ging die Aktivität der 6-O-Methyltransferase bereits nach 3 Monaten vollständig verloren. Dieses unterschiedliche Verhalten kann nur durch zwei getrennte Enzymproteine erklärt werden.

Die Eigenschaften der beiden methylierenden Enzymaktivitäten unterscheiden sich in einigen Punkten deutlich voneinander. Während die 4'-O-Methyltransferase N-methylierte Substrate wie Laudanosolin oder 6-O-Methyllaudanosolin etwa um den Faktor 10 schneller umsetzt als die entsprechenden N-Norverbindungen, reagiert die 6-O-Methyltransferase mit den N-methylierten Substraten Laudanosolin und 4'-O-Methyllaudanosolin überhaupt nicht. Ein bedeutender Unterschied liegt

auch in der Stereoselektivität der beiden Aktivitäten. Die 4'-O-Methyltransferase setzt ausschließlich (S)-konfigurierte Substrate um, die 6-O-Methyltransferase dagegen zeigt keine ausgeprägte Stereoselektivität. Die Versuche, die 4'-O-Methyltransferase mit (R)-konfigurierten Substraten zu hemmen, haben gezeigt, daß dieses Enzym schon bei der Bindung des Substrates, und nicht erst bei der Methylgruppenübertragung, zwischen den beiden Konfigurationen an C-1 differenziert. Die 6-O-Methyltransferase besitzt diese Fähigkeit offenbar nicht. Dieses entgegengesetzte Verhalten gegenüber ihren Substraten, deutet auf einen unterschiedlichen Bau der aktiven Zentren dieser beiden Aktivitäten. Die Stereoselektivität einer der drei Methyltransferasen, die an der Reticulinbiosynthese beteiligt sind, konnte bereits auf Grund von Ergebnissen von Fütterungsexperimenten gefordert worden. Danach wurde nur (S)-Norlaudanolin aber nicht das (R)-Enantiomere in Morphin inkorporiert, dessen Vorstufe aber (R)-Reticulin ist (BATTERSBY et al., 1965). Ebenso wurde ausschließlich (S)-Cocclaurin und nicht (R)-Cocclaurin in Protoberberine, Benzophenanthridine und Morphinandienone eingebaut (STADLER et al., 1987). Von Laudanolin wurde ebenfalls nur das (S)-Enantiomere in Papaverin und Morphin eingebaut (BROCHMANN-HANSEN et al., 1975). Die für die Morphinbiosynthese notwendige Umwandlung der (S)- in die (R)-Konfiguration findet erst auf der Stufe von Reticulin statt (BORKOWSKY et al., 1977).

Einen weiteren, aber nicht sehr markanten Unterschied zeigen die beiden Enzymaktivitäten in ihrem pH-Optimum, das bei 8,4 (4'OMT) bzw. 7,8 (6 OMT) liegt.

Das Auftreten zweier Enzymaktivitäten in einer Präparation, die in ihren Eigenschaften so deutlich voneinander abweichen, macht es wahrscheinlich, daß es sich bei den beobachteten methylierenden Aktivitäten nicht um die Reaktionen eines Enzyms handelt, sondern daß zwei Proteine streng regiospezifisch jeweils eine Reaktion katalysieren. Die Schwierigkeiten bei der Trennung dieser beiden Aktivitäten zeigen jedoch, daß sich diese beiden Proteine in ihren

physikalisch-chemischen Parametern wie Isoelektrischer Punkt, Nettoladung und Ausbildung hydrophober Bereiche außerordentlich ähnlich sein müssen. Der Unterschied im Molekulargewicht und in der Funktion der Enzyme deuten aber an, daß Differenzen im Bau der beiden Proteine vorliegen müssen. Nur die Bestimmung der Aminosäuresequenz der beiden Enzyme wird über ihre eventuelle Verwandtschaft Auskunft geben können, wenn es gelingt, die beiden Enzyme voneinander zu trennen.

Die dritte Methylgruppe des Reticulins wird durch N-Methyltransferasen übertragen. Im Gegensatz zu den beiden O-Methyltransferasen, trat dieses Enzym in dem untersuchten Gewebe von Berberis koetianeana in einer heterogenen Formenvielfalt auf. Durch säulenchromatographische Trennung nach Ladung, Molekulargewicht und Hydrophobizität, konnten vier unterscheidbare Enzymformen isoliert werden. Das Vorkommen multipler Enzymformen ist ein weit verbreitetes Phänomen (MARKERT, 1975), und auch für den Bereich der Alkaloidbiosynthese wurde mit der Strictosidin-Synthase aus Catharanthus roseus ein Enzym beschrieben, das in insgesamt 7 Enzymformen auftritt, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden (PFITZNER, 1984). Auch WAT et al. (1986) erwähnen in ihrer Arbeit über die N-Methyltransferase aus Berberis vulgaris das Auftreten einer zweiten Enzymaktivität, die sie aber nicht näher charakterisieren.

Zwischen den verschiedenen Formen der N-Methyltransferase konnten Unterschiede beim Molekulargewicht, dem pH-Wert, bei dem sie ihre maximale Aktivität entwickeln und in ihrer Aktivität gegenüber den getesteten Substraten festgestellt werden. Sie sind in Tabelle 25 zusammengefaßt.

Eine exakte Quantifizierung und ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten der einzelnen N-Methyltransferase-Enzyme gegenüber einzelnen Substraten war nicht möglich, da die Enzyme nicht zur Homogenität gereinigt wurden.

	NMT-I	NMT-IIa	NMT-IIb	NMT-III
Molekulargewicht (kD)	60	78	60	60
bestes Substrat	(R)-THP	(R)-Cocclaurin		(R)-Cocclaurin
pH-Optimum	7,4	7,4		6,8

Tabelle 25 Unterschiedliche Eigenschaften der verschiedenen N-Methyltransferase-Enzyme aus *Berberis koetianeana* Zellkulturen. Die Substratspezifität und das pH-Optimum von NMT-IIa und -IIb wurde mit einer Enzympräparation bestimmt, die beide Enzymformen enthielt.

(R)-THP = (R)-Tetrahydropapaverin.

Den aus *Berberis koetianeana* isolierten N-Methyltransferasen ist gemeinsam, daß sie praktisch nur Substrate umsetzen, die in Stellung 6 bereits eine O-Methylgruppe tragen, und daß sie keine ausgeprägte Stereoselektivität gegenüber ihren Substraten besitzen.

Die Abfolge der enzymatischen Reaktionen, die zum Reticulin führen ist noch nicht endgültig abgeklärt, obwohl die meisten daran beteiligten Enzyme ebenfalls gereinigt und charakterisiert worden sind (ZENK, 1985). Wurde zunächst die Bildung von Norlaudanosolin als erster Schritt zur Bildung des Benzylisochinolin Gerüsts angesehen (vergl. SPENSER, 1966; RÜFFER et al., 1981), so deuten neuere Ergebnisse darauf hin, daß gleichberechtigt, oder vielleicht sogar bevorzugt, ein Weg über Norcocclaurin, das eine Hydroxylgruppe weniger besitzt als Norlaudanosolin, zum Reticulin führt (STADLER et al., 1987). Die Entscheidung, welche der beiden Routen zu Reticulin eingeschlagen wird, wird wohl bereits bei der Bereitstellung des entsprechend hydroxylierten Phenylacetaldehyds fallen (RÜFFER und ZENK, 1987). Die Norlaudanosolin Synthase, die die erste Reaktion zur Bildung der Benzylisochinolin-Alkaloide katalysiert, differenziert nicht zwischen den beiden Vorstufen (SCHUMACHER et al., 1983).

Die Reihenfolge, in der die drei Methylgruppen des Reticulins eingeführt werden, ist ebenfalls noch sehr spekulativ.

Generell wird angenommen, daß es nicht zu einer willkürlichen Reihenfolge bei solchen sukzessiven Methylierungen kommt, wie sie auch bei anderen Naturstoffgruppen auftreten. So konnte für die polymethylierten Flavonole aus Chrysosplenium americanum (Saxifragaceae) von IBRAHIM et al., (1987) eine genaue Abfolge der insgesamt fünf Methylierungsschritte an Hand der Substratspezifität und der kinetischen Parameter der beteiligten Methyltransferasen angegeben werden.

Bei der Methylierung von 4,5-Dihydroxy-3-methoxy-phenethylamin, der Vorstufe der einfachen Tetrahydroisochinolin-Alkaloide, ist deren Reihenfolge ausschlaggebend für das weitere Schicksal der Verbindung. Die Einführung der Methylgruppe in meta-Stellung verhindert den Ringschluß zum Isochinolin und leitet zum Mescalol, während Methylierung in para-Stellung diesen Ringschluß zum Anhalamin und ähnlichen Verbindungen ermöglicht (PAUL, 1973).

BROCHMANN-HANSEN et al. (1975) haben bei ihren Untersuchungen zur Papaverinbiosynthese eine Reihe von verschiedenen O-methylierten Benzylisochinolininen als Vorstufen in Fütterungsexperimenten mit Papaver somniferum Pflanzen eingesetzt, um herauszufinden in welcher Reihenfolge die weiteren Methylgruppen eingebaut werden. Ein einheitlicher Weg vom Norlaudanolin zum Papaverin konnte damit allerdings nicht aufgezeigt werden. Vielmehr wurden unterschiedlich methylierte Vorstufen wie z.B. Norreticulol, Nororientalin, Norisorientalin und Norprotosinomenin etwa gleich gut in Papaverin eingebaut, wobei offenbar auch die notwendige Aromatisierung des Ringes B keinen festen Platz in dieser Abfolge zu haben scheint. Sie ist nicht von einer vollständigen O-Methylierung des Substrates abhängig. Methylierungen können also auch noch im bereits oxidierten Molekül stattfinden. Auch für die Bildung des all-methylierten Laudanosins werden fünf verschiedene Varianten angegeben, die sich im Laufe der Fütterungsexperimente als durch die Pflanze realisierbar herausgestellt haben. Die Frage stellt sich natürlich, ob die Pflanze all diese Wege auch allein, ohne die Zufuhr potentieller Vorstufen von außen, beschreitet. Deshalb müßte

zusätzlich auch das Vorkommen der unterschiedlichen Intermediate in der Pflanze abgesichert werden (SPENSER, 1966; BROCHMAN-HANSEN et al., 1975).

Bei der Untersuchung der Morphinbiosynthese durch BATTERSBY et al. (1968) und der Reticulinbiosynthese durch BHAKUNI et al. (1977) konnte mit Fütterungsexperimenten an Papaver somniferum bzw. Litsea glutinosa (Lauraceae) gezeigt werden, daß Laudanosolin, das bereits die N-Methylgruppe trägt deutlich schlechter als Norlaudanosolin oder Norreticulin in das untersuchte Endprodukt gelangen. Das gab zu der Annahme Anlaß, daß die N-Methylierung der letzte Schritt bei der Einführung der drei Methylgruppen in das Reticulin sein müßte. BROCHMAN-HANSEN et al. (1975) hatten dagegen bei ihren Fütterungen herausgefunden, daß (S)-Laudanosolin und (S)-Norreticulin beide gleich gut in Morphin, das bekanntlich von (R)-Reticulin abstammt, eingebaut werden.

Aus diesen Ergebnissen zeichnet sich also kein klares Bild ab, wie der Ablauf der Methylierungen der Benzylisochinoline organisiert ist.

Die Substratspezifität der an diesen Methylierungen beteiligten Enzyme und ihre Kinetik, sowie die Konzentrationen bzw. überhaupt das Vorkommen der potentiellen Vorstufen in der Zelle sind die entscheidenden Größen, an Hand derer über die Abfolge der Reaktionen entschieden werden kann.

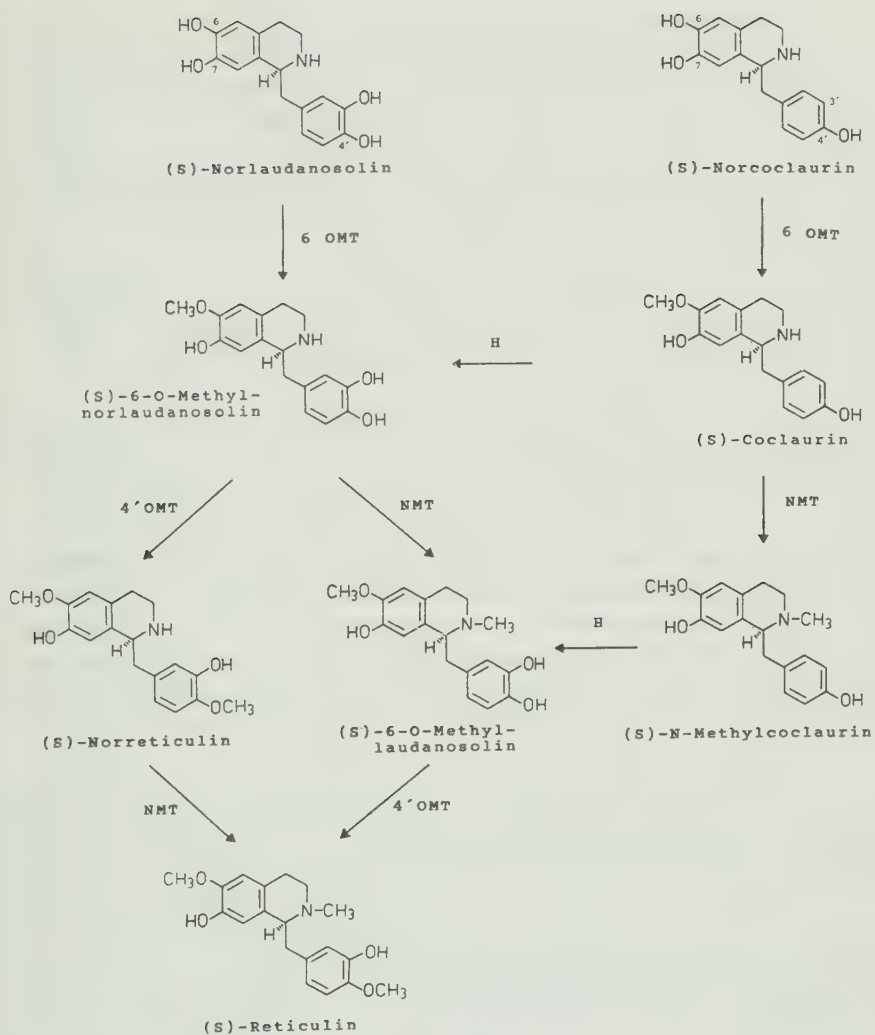
Die Substratspezifität der untersuchten Methyltransferasen aus Berberis koetianeana läßt einige Wege zum Reticulin sicher ausschließen und andere möglich erscheinen. Die N-Methylierung wird sicher nicht der erste Schritt sein, da einerseits (S)-Norcoclaurin nur sehr langsam und (S)-Norlaudanosolin von den N-Methyltransferasen gar nicht umgesetzt werden, und andererseits die N-methylierten Vorstufen wie Laudanosolin und 4'-O-Methyllaudanosolin nicht mehr von der 6-O-Methyltransferase als Substrate angenommen werden. Auch die 4'-O-Methyltransferase wird nicht die erste Methylgruppe einführen, da sie gegenüber bereits N-methylierten Substraten etwa eine 10-fach höhere Aktivität aufweist als gegenüber den N-Norverbindungen. Mit (S)-Norcoclaurin reagiert

sie überhaupt nicht und mit (S)-Norlaudanosolin wohl nur sehr langsam. Das entstehende (S)-4'-O-Methylnorlaudanosolin würde darüberhinaus auch von den beiden anderen Enzymen nicht weiter methyliert werden können. Also wird der erste Schritt durch die 6-O-Methyltransferase katalysiert, für die (S)-Norcoclaurin und (S)-Norlaudanosolin die besten Substrate darstellen, die zu (S)-Coclaurin und (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin methyliert werden. Eine deutliche Präferenz gegenüber einem der beiden möglichen Startpunkte zum Reticulin besitzt dieses Enzym nicht.

Als zweiter Methylierungsschritt kommt die N-Methylierung in Frage. Die entstandenen (S)-Coclaurin und (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin werden von den N-Methyltransferasen umgesetzt, wenn sie auch nicht die besten Substrate dieser Enzyme darstellen. Für (S)-Coclaurin wäre die einzig mögliche Alternative in Richtung Reticulin die Einführung der 3'-Hydroxylgruppe, die zum (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin führt. 4'-O-Methylierung ist nicht möglich, weil Coclaurin nicht von der 4'-O-Methyltransferase umgesetzt wird. Für (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin besteht diese Möglichkeit dagegen. Wie bereits erwähnt, wird (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin allerdings deutlich langsamer umgesetzt als sein bereit N-methyliertes Pendant. Das so entstehende (S)-Norreticulin stellt dann aber ein sehr gutes Substrat für die N-Methyltransferasen dar, die es zum Reticulin umsetzen.

Der Einfluß der N-Methylierung der beiden potentiellen Substrate der 4'-O-Methyltransferase, (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin und (S)-6-O-Methyl-laudanosolin, auf deren K_m -Werte ist untersucht worden. Der K_m -Wert der N-Norverbindung ist um den Faktor 4-5 niedriger als der der N-Methylverbindung. Diese durch den niedrigeren K_m -Wert ausgedrückte höhere Affinität der Norverbindung zum Enzym, verbunden mit einer geringen Umsatzrate, ließ sich auch durch die Hemmwirkung dieser Substanz gegenüber der Übertragung der Methylgruppe auf (S)-6-O-Methyl-laudanosolin demonstrieren.

Die K_m -Werte von (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin gegenüber NMT-II und NMT-III betragen etwa ein Drittel derer von (S)-



Biosynthesewege des Reticulins in *Berberis* Zellkulturen. Die verschiedenen Routen wurden an Hand der Eigenschaften der beteiligten Methyltransferasen aufgestellt. H steht für eine Hydroxylase, die die OH-Gruppe in Position 3' einführt.

Abb. 50

Norreticulin, gegenüber NMT-I gibt es keinen Unterschied zwischen den beiden Substraten. Einem niedrigeren K_m -Wert von (S)-6-O-Methylnorlaudanolin steht eine etwa 2-fach höhere Umsatzgeschwindigkeit von (S)-Norreticulin durch die N-Methyltransferasen gegenüber. Diese Differenzen bei der N-Methylierung sind zu gering, um Bedeutung für die Regulation eines Stoffwechselweges zu haben. Sowohl der Weg über 6-O-Methylaudanolin als auch über Norreticulin ist also von einem enzymatischen Blickpunkt aus möglich. Der über 6-O-Methylaudanolin sollte aber auf Grund der 10-fach höheren Enzymaktivität der 4'-O-Methyltransferase effizienter ablaufen als der über Norreticulin.

Findet die Hydroxylierung in der Norcoclaurin-Route erst auf der Stufe von N-Methylcoclaurin statt, so entsteht ohnehin (S)-6-O-Methylaudanolin, das von der 4'-O-Methyltransferase zu Reticulin umgesetzt wird. Über die Substratspezifität der Hydroxylase liegen noch keine genauen Erkenntnisse vor, N-Methylcoclaurin stellt aber ein Substrat dieses Enzyms dar (S.Löffler, pers. Mitteilung).

Ein Schema mit den verschiedenen Varianten, die bei Berücksichtigung der Eigenschaften der beteiligten Enzyme zur Bildung von Reticulin führen können, ist in Abb. 50 dargestellt.

Ob die dargestellten Überlegungen den Ablauf in der Zelle richtig wiedergeben, hängt aber eben nicht nur von den in vitro gemessenen Enzymeigenschaften ab. Ein Nachweis der durch die Zelle tatsächlich gebildeten Intermediate, die möglicherweise nur in Spuren vorkommen, ist unerlässlich. Während Norcoclaurin (=Higenamin), Coclaurin und N-Methylcoclaurin bereits mehrfach aus Pflanzenmaterial isoliert werden konnte (SANTAVY, 1979), steht der Nachweis von dem in der Literatur so oft als Precursor genannten Norreticulin oder auch von 6-O-Methylaudanolin als Bestandteil in der Alkaloidfraktion entsprechender Pflanzen oder auch Zellkulturen immer noch aus. Ein Grund dafür mag die Empfindlichkeit dieser Substanzen gegen Alkalien sein, die üblicherweise für die Alkaloidextraktionen verwendet werden.

Einen anderen Ansatz, der den Ablauf der dargestellten Biosynthesewege verändern kann, und auch die auf Grund der Enzymkinetik unwahrscheinlicheren Varianten realisieren könnte, haben IBRAHIM et al. (1987) vorgeschlagen. Für den Ablauf der Methylierungen bei Flavonolen postulieren sie eine lockere Assoziation der beteiligten Methyltransferasen, Hydroxylasen und Glucosyltransferasen entlang einer Membranoberfläche. Die Abfolge der Reaktionen wird so durch die räumliche Anordnung der Enzyme bestimmt. Inwieweit solche Vorstellungen auch für die Reticulinbiosynthese zutreffen, kann jedoch nicht beurteilt werden.

Die letzte Phase der Bildung des Berberins von Reticulin ausgehend, scheint zweifelsfrei geklärt zu sein (s. Abb 3, S. 9). Der Ablauf in der Reihenfolge: Bildung der Berberinbrücke, Methylierung der OH-Gruppe in Position 9, Aromatisierung des Ringes C und zuletzt Bildung der Methylendioxybrücke, ergibt sich aus der Substratspezifität der Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren. Dieser Teil der Biosynthese ist intrazellulär streng kompartimentiert. Die daran beteiligten Enzyme, Berberinbrücken-Enzym, 9-O-Methyltransferase, (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase und Berberin Synthase kommen gemeinsam in einem offenbar ausschließlich der Alkaloidsynthese dienenden Vesikel vor (AMANN et al., 1986; GALNEDER, 1986; entgegen MÜMMLER et al., 1985 auch die Scoulerin-9-O-Methyltransferase, pers. Mitteilung von Dr. M. Rüffer).

Während für die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX) von AMANN (1986) der Reaktionsmechanismus experimentell nachgewiesen werden konnte, besteht über den Mechanismus, mit dem die Berberinbrücke und die Methylendioxybrücke des Berberins gebildet werden, weiterhin Unklarheit, obwohl schon seit Beginn der Erforschung der Protoberberin-Alkaloide darüber spekuliert wird. Im wesentlichen ist ein Ablauf der beiden Reaktionen über eine ionische oder eine diradikalische Zwischenstufe denkbar (BARTON et al., 1963a,b,c) (s. Abb. 46, 47).

In dieser Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, mit Hilfe chiral markierter Methylgruppen zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu differenzieren. Die stereochemischen Veränderungen, denen die chiral markierte N-Methylgruppe des Reticulins bzw. die 3-O-Methylgruppe des Columbamins bei der Bildung dieser Methylenbrücken unterliegen, sollten eine Beurteilung ermöglichen, über welche Zwischenstufe die Reaktionen laufen. Die Schwierigkeit bei diesen Untersuchungen bestand vor allem in der zweifelsfreien Bestimmung der Konfiguration der gebildeten Methylenbrücken, für die keine geeigneten, in ihrem sterischen Verlauf bekannten, chemischen Abbauewege zur Verfügung stehen, um anschließend, die Chiralität des Methylenkohlenstoffs mit den für diese Technik üblichen, enzymatischen Methoden analysieren zu können.

Die Bildung der Berberinbrücke, ausgehend von (S)-(N-Methyl-R)- und (S)-(N-Methyl-S)-Reticulin, wurde kinetisch, an Hand des aus der N-Methylgruppe freigesetzten Tritiums verfolgt. Dabei konnte festgestellt werden, daß nach vollständigem Ablauf der Reaktion nur etwa ein Viertel der theoretisch möglichen Menge Tritium ausgebaut worden war. Der Isotopeneffekt des Berberinbrücken-Enzyms beträgt danach mindestens $k_H/k_T=4$ (Dieser Wert gilt nur näherungsweise, da nicht nur Tritium und Wasserstoff in der Methylgruppe enthalten sind, sondern auch Deuterium) und ist damit mehr als doppelt so hoch wie er von STEFFENS (1984) bestimmt worden war ($k_H/k_T=1.6$). Dieser kinetische Isotopeneffekt, der in etwas abgeschwächter Form auch zwischen Wasserstoff und Deuterium auftritt, ist die Voraussetzung für eine Bestimmung der Konfiguration der Methylengruppe durch eine nachfolgende, streng stereospezifisch ablaufende enzymatische Dehydrierung der Methylengruppe. Das Ausmaß der Tritiumretention dieser Reaktion sollte Aufschluß über die Konfiguration der Methylengruppe geben. Für diese Nachweisreaktion wurde die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase verwendet, deren Tritiumfreisetzung ebenfalls kinetisch verfolgt wurde (Abb. 48, 49).

Dabei konnte allerdings kein Unterschied zwischen der aus einer R-Methylgruppe und der aus einer S-Methylgruppe gebildeten Methylengruppe festgestellt werden. Dies kann daran liegen, daß bereits die enzymkatalysierte Bildung der Berberinbrücke nicht stereospezifisch verläuft, so daß Tritium, trotz Isotopeneffekt, zu gleichen Teilen in die pro-R und pro-S Stellung der Berberinbrücke gelangt (es entstehen die 4 Spezies A+B+C+D; s.Abb. 48). In diesem Fall könnte auch ein stereospezifischer Ablauf der Oxidase-Reaktion nur 50% Tritiumausbau aus den beiden, aus enantiomeren Methylgruppen entstandenen Methylengruppen bewirken.

Kommt es dagegen zu einer Ungleichverteilung von Tritium in die Positionen pro-R und pro-S, was bei dem beobachteten Isotopeneffekt des Berberinbrücken-Enzyms, im Falle eines stereospezifischen Verlaufes der Berberinbrücken Bildung eintreten würde (es entstehen nur A+B bei Inversion oder C+D bei Retention der Konfiguration; s.Abb. 48), so kann es an einem nicht stereospezifischen Verlauf der Dehydrierung liegen, daß trotz dieser Ungleichverteilung des Tritiums, aus beiden enantiomeren Methylengruppen die gleiche Menge Tritium ausgebaut wird.

Die Dehydrierung an C-8, also dem Methylenkohlenstoff, verläuft vermutlich nicht stereospezifisch, da nach dem von AMANN (1986) angegebenen Reaktionverlauf, die Oxidase nur die Dehydrierung der Bindung C-14 - N-7 katalysiert, und die Aromatisierung des Ringes C von Scoulerin dann spontan, nicht enzymatisch und damit auch nicht stereospezifisch erfolgt.

Zum Verlauf dieser gekoppelten Enzymreaktionen kann also nur eine Aussage sicher getroffen werden: mindestens eine der beiden Reaktionen verläuft nicht stereospezifisch. Die eingangs gestellte Frage nach dem möglichen Intermediat der Reaktion bleibt nach dem Ausgang dieser Untersuchung unbeantwortet.

Eine weitere Klärung dieses Problems wird davon abhängen, ob es gelingt, ausreichende Mengen an chirale markiertem Scoulerin enzymatisch herzustellen, um es mit ^3H -NMR untersuchen

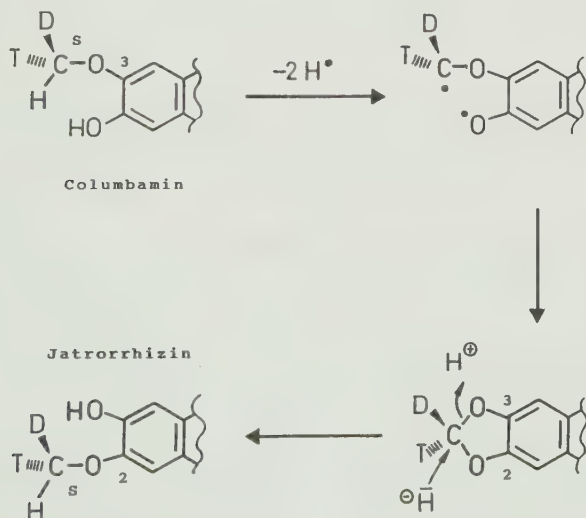
zu können. Im Moment erscheint dies als die einzige Möglichkeit, Informationen über die, nach der Berberinbrücken-Enzym-Reaktion in der Methylengruppe vorliegende Isotopenverteilung zu erhalten.

Zur Bestimmung der sterischen Verhältnisse in der 2,3-Methylenedioxybrücke des Berberins, die wiederum Rückschlüsse auf ihre Entstehung erlauben, wurde die chiral markierte Methylenedioxybrücke in eine, in ihrer Konfiguration analysierbare, chirale Methylgruppe enzymatisch abgebaut. Dieser Abbau erfolgte durch ein bislang noch nicht isoliertes Enzym aus Berberis Zellkulturen, das Berberin durch Öffnen der Methylenedioxybrücke in Jatrorrhizin überführt. Deshalb wurde die ganze Reaktionssequenz in vivo durchgeführt. (S)-Reticulin, dessen außerordentlich gute Inkorporation in Jatrorrhizin in Fütterungsexperimenten mit Berberis Kalluskulturen bestätigt werden konnte, und das in Position 6 die chirale Methylgruppe trug (diese Stellung entspricht der Position 3 im Columbamin) wurde als Ausgangsmaterial gewählt. Es wurde an Kalluskulturen von Berberis koetianeana appliziert, und das gebildete Jatrorrhizin isoliert. Die Bestimmung der Konfiguration der 2-Methoxygruppe ergab, daß diese Methylgruppe nach ihrer Übertragung ihre Konfiguration nicht verändert hat. Die Enantiomeren Reinheit dieser Methylgruppe betrug allerdings nur etwa die Hälfte des erwarteten Wertes, was bedeutet, daß es im Verlauf der beiden Reaktionen auch zu einer beträchtlichen Razemisierung gekommen ist.

In Abb. 51 ist ein möglicher Ablauf der beiden Reaktionen der Bildung und Spaltung der 2,3-Methylenedioxybrücke dargestellt. Da wieder nur das Resultat einer Kombination von zwei in ihrem Ablauf unbekannten enzymatischen Reaktionen beobachtet werden kann, ist eine Interpretation von der Annahme abhängig, daß die Öffnung der Methylenedioxybrücke wahrscheinlich durch den Angriff von H^- stereospezifisch von der der Bindung $CH_2 - O-3$ gegenüberliegenden Seite aus erfolgt und damit diese Reaktion mit Inversion abläuft (KO-BAYASHI et al., 1987).

Da aber gegenüber der ursprünglichen 3-O-Methylgruppe des Columbamins in der neu entstandenen 2-O-Methylgruppe des Jatrorrhizins auch der Sauerstoff quasi seine räumliche Position am Methylkohlenstoff vertauscht hat, besitzt die 3-O-Methylgruppe dennoch die selbe räumliche Konfiguration wie die Methylengruppe, da sich zwei Inversionen überlagern. Dann muß aber die Bildung der Methylendioxybrücke auch unter Retention ablaufen, um insgesamt Retention der Konfiguration zu beobachten.

Die Retention bei der Methylengruppenbildung läßt sich mit einer diradikalischen Zwischenstufe erklären. Das nach der Abspaltung von $H^\bullet$ entstehende Methylenradikal wird durch das



Möglicher Reaktionsablauf der Bildung und der Öffnung der 2,3-Methylendioxybrücke im Berberin. Dargestellt ist der Verlauf für eine S-konfigurierte Methylgruppe. Die radikalische Reaktion erfolgt sehr rasch unter Beibehaltung der Konfiguration der Methylgruppe. Die Spaltung verläuft mit Inversion. Da aber der Sauerstoff-3 an der Methylgruppe im Columbamin gegen Sauerstoff-2 im Jatrorrhizin ausgetauscht wird bleibt auch bei dieser Reaktion die Konfiguration erhalten.

Abb. 51

Enzym in einer Stellung gehalten, die die Brückenbildung sofort nach Entstehung des Radikals und von der selben Seite her, von der H[•] abgetrennt wurde, ermöglicht. Durch die ungehinderte Rotation des Methylenradikals kommt es daneben zu der beobachteten Razemisierung (KOBAYASHI et al., 1987). Es ist also eine Frage der Lebensdauer des postulierten Radikals, im Verhältnis zur seiner Rotation, in welchem Ausmaß Razemisierung eintritt.

Diese Darstellung eines Ablaufs der Bildung der Methylen-dioxybrücke im Berberin ist aber nur dann gültig, wenn die Annahme über die Spaltungsreaktion zutrifft. Auch in diesem Zusammenhang wäre es nötig, die Methylenbrücke direkt mit ³H-NMR untersuchen zu können. Im Gegensatz zur Berberinbrücke geben die Methylen-Wasserstoffe hier aber ein einziges Signal und sind nicht unterscheidbar. Eine Lösung besteht in der Einführung einer weiteren chiralen Gruppe in das Berberin, etwa über den Stickstoff, deren räumliche Anordnung im Molekül genau bekannt sein muß, und die mit den Methylen-Wasserstoffen unterschiedliche Kopplungen ergibt. Ein solches Berberin-Derivat ist aber noch nicht bekannt.

Als wichtige Voraussetzung für die geschilderten Untersuchungen, muß die Konfiguration der enzymatisch übertragenen Methylgruppen in dem als Ausgangspunkt verwendeten Reticulin genau bekannt sein. Bei den meisten der bisher untersuchten Methyltransferasen (WOODARD et al., 1980b) aus den unterschiedlichsten Stoffwechselbereichen resultiert bei der Übertragung der Methylgruppe aus SAM eine Konfigurationsumkehr der Methylgruppe. Diese Ergebnisse, die ebenfalls mit Hilfe chiraler Methylgruppen gewonnen wurden, decken sich mit Untersuchungen von HEGAZI et al. (1976) über den Übergangszustand bei der von Catechol-O-Methyltransferase aus Rattenleber katalysierten Methylgruppenübertragung. Diese Autoren konnten nachweisen, daß eine CD₃-Methylgruppe etwas schneller übertragen wird als eine CH₃-Gruppe. Durch Messung dieses sekundären inversen Isotopeneffektes k_H/k_D bei der Transferreaktion, schlossen sie auf einen S_N2-Mechanismus,

der die Konfigurationsumkehr der Methylgruppe erklärt. Danach erscheint es als gesichert, daß die Übertragung der Methylgruppe direkt von SAM auf das Akzeptormolekül in einem Schritt erfolgt, und nicht nach einem Ping-Pong-Mechanismus, über eine methylierte Zwischenstufe des Enzyms, wie er auf Grund kinetischer Untersuchungen von BORCHARD (1973) vorgeschlagen worden war. Allerdings sind auch Fälle beschrieben worden, bei denen die Konfiguration der Methylgruppe bei der Übertragung erhalten bleibt (ZYDOWSKY et al., 1986; HOUCK et al., 1986).

Die Untersuchung der durch die N-Methyltransferase und 6-O-Methyltransferase aus Berberis koetianeana übertragenen Methylgruppen hat gezeigt, daß diese Enzyme der allgemeinen Regel entsprechen. Die Konfiguration der Methylgruppe wurde in beiden Fällen bei der Übertragung umgekehrt, die Enantiomeren Reinheit dabei nicht verringert.

Neben den Untersuchungen zur Biosynthese der Protoberberin-Alkaloide, war die enzymatische Herstellung von Intermediaten, die für diese Untersuchungen benötigt wurden, ein Ziel dieser Arbeit.

Mit der Durchführung von Synthesen mit trägergebundener SAM-Synthetase aus E. coli und Berberinbrücken-Enzym, allein und gemeinsam mit der (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase aus Berberis Zellkulturen konnte gezeigt werden, daß auf diesem Wege mit einer letztlich sehr einfachen und kontinuierlich arbeitenden Methode ohne großen apparativen Aufwand, die angestrebten Produkte prinzipiell hergestellt werden können. Darüber hinaus waren die Produkte der enzymatischen Umsetzung, auf Grund der milden Reaktionsbedingungen, nur in ganz geringem Ausmaß mit Zersetzungs- oder Nebenprodukten verunreinigt, und damit leicht in reiner Form zu isolieren.

Ein bedeutender Vorteil der enzymatischen, gegenüber der rein chemischen Katalyse liegt ferner in der Regiospezifität, mit der die Reaktionen ablaufen. Mit den Methyltransferasen aus Berberis Zellkulturen war es möglich, gezielt die verschiedenen Methylgruppen mit einer radioaktiven Markie-

rung zu versehen. Diesem Vorteil steht natürlich der Nachteil gegenüber, daß es keinen universellen enzymatischen Katalysator geben kann, sondern quasi jede Reaktion einen eigenen benötigt.

Die noch zu diskutierenden Probleme, wie geringe Haltbarkeit der Enzyme und ihre geringe Produktivität, die mit der Verwendung der Enzyme bei der Herstellung substanzieller Mengen der gewünschten Produkte auftraten, stellen für diese Anwendung noch eine beträchtliche Hürde dar. Bei der Synthese radioaktiv markierter Substanzen für den Laborbedarf treten diese Probleme dagegen in den Hintergrund, da bei diesen Verfahren nur geringste Substratmengen im nmol- oder μ mol-Bereich umgesetzt werden müssen. Die Ausbeuten bei diesen Umsetzungen lagen in der Regel zwischen 60 und 90% der eingesetzten radioaktiven Vorstufe.

Es ist aber nicht zu übersehen, daß der einfachen Durchführung der Synthesen mit Hilfe von Enzymen, einige Anforderungen an die vorangehenden, vorbereitenden Schritte gegenüberstehen. Der einschränkendste Faktor ist die Verfügbarkeit ausreichender Enzymmengen. Durch die Knappheit der Enzyme, die mit erheblichem Aufwand aus Pflanzenzellen gewonnen werden müssen, verlagert sich die Problematik von der Synthese einer Substanz auf die Isolierung des die Reaktion ermöglichenden Katalysators.

Einen Ausweg, der in Zukunft auch für aus biotechnologischer Sicht interessante Enzyme aus dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel realisiert werden kann, zeigt das Beispiel der SAM-Synthetase aus dem Bakterium E.coli. Durch die Übertragung des, allerdings auch aus dem Mikroorganismus stammenden Strukturgens für dieses Enzym in den E.coli-Stamm DM25 pkA8 und die Unterbindung der Repression dieses Gens (MARKHAM et al., 1980,1984) wird das Protein von dem Mikroorganismus in unphysiologisch hoher Menge überproduziert, und konnte so in Mengen isoliert werden, die eine Produktion von SAM mit diesem Enzym im Gramm-Maßstab ermöglichte. Die Voraussetzungen für ein vergleichbares Vorgehen mit pflanzlichen Enzymen

sind durch die Reinigung und Charakterisierung bis auf die genetische Ebene dieser Enzyme zu schaffen.

Ein zweiter kritischer Punkt bei der Anwendung von Enzymen für synthetische Aufgaben, ist ihre Überführung in eine verfahrenstechnisch nutzbare Form. Der mit Glutardialdehyd derivatisierte, anorganische Träger CPG-10 Glas hat sich mit allen untersuchten Enzymen als sehr geeignet, in Bezug auf die Erhaltung der Enzymaktivität während des Vorgangs der Immobilisierung und im Vergleich mit anderen "weichen" Gelmaterialien als Träger, erwiesen. Speziell für das Berberinbrücken-Enzym stellte die mit guten Ausbeuten an gebundener Enzymaktivität verlaufende Immobilisierung an CPG-10 Glas (80-90%) kein Problem dar. Daß sich die Auswahl des Trägermaterials möglicherweise auch unter einem anderen Aspekt auf den Erfolg des Verfahrens auswirken kann, wurde an dem in allen Ansätzen aufgetretenen Problem der starken Haftung der Substrate und/oder Produkte an dem Träger deutlich, auf das auch von AMANN (1986) in Zusammenhang mit immobilisierter (CPG-10 Glas) (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase hingewiesen wurde.

Die relativ kurze Lebensdauer der eingesetzten Enzyme stellt bislang sicherlich das größte Problem bei ihrem Einsatz dar. Vor allem für die Verwendung in kontinuierlich arbeitenden Verfahren ist eine konstante Produktbildung eine wichtige Voraussetzung für deren rentablen Betrieb (WEETALL und PITCHER, 1986). Um in dieser Hinsicht Verbesserungen zu erreichen, müßten andere Formen der Immobilisierung, von denen hier nur die kovalente Anbindung an einen unlöslichen Träger untersucht worden ist, getestet werden. Eine Voraussage für ein erfolgreiches Verfahren ist schwer möglich, da die Ursachen, die zu dieser raschen Inaktivierung, auch der trägergebundenen Enzyme führen, erst zu ergründen sind. Es wurde jedenfalls deutlich, daß eine einfache Verknüpfung des Proteins über wahrscheinlich nur wenige Punkte mit einem unflexiblen Träger nicht unbedingt einen Schutz vor dem Verlust der räumlichen Faltung des Enzyms darstellt, der allgemein als die Ursache für den Verlust der Enzymaktivität

angesehen wird. Eine Alternative könnte die kovalente Einbindung der Enzyme in eine Gelmatrix sein, die dem Protein rundum festen Halt geben kann, da sie sich der Form des Enzyms anpaßt (MARTINEK et al., 1977). Nach dieser Methode haben GROSS et al., (1983) SAM-Synthetase aus Hefe immobilisiert, aber in der Abnahme der Aktivität unter den Reaktionsbedingungen unterscheidet sich diese Präparation kaum von dem in dieser Arbeit verwendeten, an CPG-10 immobilisierten Enzym.

Die Immobilisierung von Enzymen ist ein Gebiet auf dem es immer noch schwer ist, verlässliche Voraussagen zu treffen, und auf dem es vor allem auf einen reichen Erfahrungsschatz ankommt. "The engineering of immobilized enzyme systems is still more art than science." (MAUGH, 1984)

V. Zusammenfassung

1. Ein neues Enzym, die SAM: 6-O-Methylaudanosolin 4'-O-Methyltransferase, das an der Biosynthese des Benzylisochinolin Alkaloids Reticulin beteiligt ist, konnte in Suspensionszellkulturen zahlreicher Arten aus 4 Pflanzenfamilien, die Isochinolin-Alkaloide enthalten, nachgewiesen werden. Berberis koetianeana zeigte den höchsten Gehalt an diesem Enzym und wurde als Quelle für die Isolierung und Reinigung der 4'-O-Methyltransferase verwendet.
2. Das Reinigungsverfahren für die 4'-O-Methyltransferase umfaßt 5 säulenchromatographische Schritte, darunter einen an einem SAH-Affinitätsmedium. Es ermöglichte die 400-fache Anreicherung der 4'-O-Methyltransferase bei Ausbeuten von etwa 5% der Ausgangsaktivität. Gemeinsam mit diesem Enzym wurde die Norlaudanosolin 6-O-Methyltransferase in einem stets annähernd konstanten Verhältnis mitangereichert. Neben diesen beiden Enzymen befand sich kein weiteres Protein in der hoch angereicherten Präparation. Beide Enzyme waren im nativen Zustand durch keine der üblichen Verfahren voneinander zu trennen.
3. An Hand der unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Methyltransferase-Aktivitäten konnte nachgewiesen werden, daß die beiden Methylgruppenübertragungen von zwei separaten Enzymen regiospezifisch katalysiert werden.
4. Die Eigenschaften der 4'-O-Methyltransferase:
Das Enzym setzt nur Substrate um, die ein Benzylisochinolin-Gerüst besitzen, das im Ring C zwei benachbarte freie OH-Gruppen in Stellung 3' und 4' trägt und an C-1 S-konfiguriert ist. Die Stereoselektivität ist bei der Bindung des Substrates an das Enzym wirksam.
 K_m -Werte für (S)-6-O-Methylaudanosolin 4,5 μM
 für (S)-6-O-Methylnorlaudanosolin 1 μM .
 für SAM 30 μM

Das Molekulargewicht wurde zu 39-41 kD mit SDS-Gelelektrophorese und zu 51 kD mit Gelpermeations-HPLC bestimmt. Das pH-Optimum liegt bei pH 8,4.

Das Enzym ist bereits mit geringen Konzentrationen von Protoberberin-Alkaloiden (0,5 mM), Metallen wie Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} (alle 1 mM) und einigen SH-Gruppen alkylierenden Reagenzien (5 mM) beträchtlich zu hemmen. Der K_i -Wert für SAH beträgt 2,5 μM . 50%-Hemmung durch die Produkte treten für (S)-Reticulin bei 70 μM und für (S)-Norreticulin bei 300 μM auf.

Bei -20°C in 20% Glycerin gelagert, beträgt die Aktivität des Enzyms nach einem Jahr noch 90-95 %, bei $+6^\circ\text{C}$ beträgt die Halbwertszeit der Aktivitätsabnahme 15 Tage und bei 20°C 3 Tage.

5. Eigenschaften der 6-O-Methyltransferase:

Auch dieses Enzym ist nur gegen Substrate mit Benzylisochinolin-Gerüst aktiv. Die benachbarten freien OH-Gruppen in Position 6 und 7 des Substrates sind essentiell. Das Enzym ist nicht stereoselektiv bezüglich C-1.

Das Molekulargewicht beträgt, wie bei der 4'-OMT bestimmt 39-41 kD bzw. 51 kD. Das pH-Optimum liegt bei pH 7,8.

Die Enzymaktivität wird bei längerem Einfrieren bei -20°C zerstört.

6. Aus Berberis koetianeana wurden 4 unterscheidbare Formen der Norreticulin N-Methyltransferase isoliert. Sie differieren in ihrem chromatographischen Verhalten an Anionenaustauscher- und hydrophoben Medien, in ihren pH-Optima, ihrem Molekulargewicht und ihrer Substratspezifität.

7. Mit Hilfe chiral markierter Methylgruppen, konnte gezeigt werden, daß die Übertragung der Methylgruppe von SAM durch die Methyltransferasen aus Berberis koetianeana nach dem für vergleichbare Enzyme üblichen $\text{S}_\text{N}2$ -Mechanismus verläuft.

8. Der Versuch, den Mechanismus der Berberinbrücken-Bildung durch kinetische Messungen der Tritiumfreisetzung aus der chiral markierten N-Methylgruppe von Reticulin aufzuklären, ist auf Grund des nicht stereospezifischen Verlaufes der Berberinbrücken-Enzym Reaktion oder der anschließenden Dehydrierung durch die (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase, nicht gelungen.
9. Durch die Untersuchung der Konfiguration der chiral markierten 3-O-Methylgruppe im Columbamin, nach ihrer intramolekularen Übertragung auf die 2-O-Position im Jatrorrhizin, konnte ein radikalischer Mechanismus für die Berberin Synthase-Reaktion, die zur Bildung der 2,3-Methylendioxybrücke im Berberin führt, postuliert werden.
10. Die aus dem E.coli-Stamm DM 25 pkA8 isolierte SAM-Synthetase wurde an einen Glasträger immobilisiert und für die Synthese von über 3 g SAM eingesetzt. Ebenso wurde $^{14}\text{CH}_3$ - und C^3H_3 -SAM enzymatisch mit Ausbeuten von 70-90%, bezogen auf die radioaktive Vorstufe, hergestellt.
11. Enzymatisch wurden drei Spezies von (S)-Reticulin hergestellt, die in jeweils einer der drei Methylgruppen eine radioaktive Markierung tragen; die Ausbeuten lagen zwischen 75 und 90%, bezogen auf die radioaktive Vorstufe.
12. Die Immobilisierung von Berberinbrücken-Enzym an einen Glas-Träger gelang in Ausbeuten von etwa 80%, bezogen auf die eingesetzte Enzymaktivität. Mit diesen Präparationen wurden Versuche zur Synthese von Biosynthese-Intermediaten durchgeführt.
Das Problem der raschen Inaktivierung der Enzyme unter den Synthesebedingungen konnte durch Immobilisierung allerdings nicht behoben werden.

VI. Literaturverzeichnis

- AMANN, M.: (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase. Das zentrale Enzym in der Oxidation von Benzylisochinolin Alkaloiden. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, (1986).
- BARTON, D.H.R.; COHEN, T.: Some Biogenetic Aspects of Phenol Oxidation. Festschrift Arthur Stoll. Birkhäuser Verlag Basel 117-144, (1957).
- BARTON, D.H.R.; KIRBY, G.W.; TAYLOR, G.B.; THOMAS, G.M.: Phenol Oxidation and Biosynthesis Part VI. The Biogenesis of Amaryllidaceae Alkaloids. J.Chem.Soc. 1963, 4545-4558, (1963a).
- BARTON, D.H.R.: The Biogenesis of Phenolic Alkaloids. Proc.Chem.Soc. 1963, 293-298, (1963b).
- BARTON, D.H.R.; HESSE, R.H.; KIRBY, G.W.: The Origine of the "Berberine Carbon". Proc.Chem.Soc. 1963, 267-268, (1963c).
- BATTERSBY, A.R.; HARPER, B.J.T.: Biogenesis of Papaverine. Proc.Chem.Soc. 1959, 152.
- BATTERSBY, A.R.: The Biosynthesis of Alkaloids. Proc.Chem.Soc. 1963, 189-200.
- BATTERSBY, A.R.; FOULKES, D.M.; BINKS, R.: Alkaloid Biosynthesis, Part 8. Use of Optically Active Precursors for Investigation on the Biosynthesis of Morphine Alkaloids. J.Chem.Soc. 1965, 3323-3332.
- BATTERSBY, A.R.; FOULKES, D.M.; HIRST, M.; PARRY, G.V.; STAUNTON, J.: Studies Related to the Formation and Oxidation of Reticuline in Morphine Biosynthesis. J.Chem.Soc. 1968, 210-216.
- BATTERSBY, A.R.; STAUNTON, J.; WILTSHIRE, H.R.; BIRCHER, B.J.; FUGANTI, C.: Synthesis of (13S)- and (13R)-(13-³H₁)-Scoulerine from Stereospecifically Labelled (R)- and (S)-(a-³H₁)-Benzyl Alcohols; Stereochemistry of Enzymic Reactions at Saturated Benzylic Carbons. J.Chem.Soc.Perkin I 1975, 1162-1171.
- BEECHER, C.W.W.; KELLEHER, W.J.: The Incorporation of Berberin into Jatrorrhizin. Tetrahedron Lett. 24, 469-472, (1983).
- BENSADOUN, A.; WEINSTEIN, D.: Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. Anal.Biochem. 70, 241-250, (1976).

- BHAKUNI, D.S.; SINGH, A.N.; TEWARI, S.; KAPIL, R.S.:
Biosynthesis of Reticuline.
J.Chem.Soc.Perkin I 1977, 1662-1666.
- BISSET, N.G.: Plants as a Source of Isoquinoline Alkaloids.
In: The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids.
Philipson, D; Roberts, M.F.; Zenk, M.H. (eds.)
Springer, Berlin 1-22, (1985).
- BLACKSHEAR, P.J.: Systems for Polyacrylamide Gel Elektrophoresis.
In: Methods in Enzymology. Jacoby, W.B.(ed.)
Academic Press, New York 104, 237-255, (1984).
- BORCHARDT, R.T.: Catechol-O-Methyltransferase 1. Kinetics on Tropolone Inhibition.
J.Med.Chem. 16, 377-382, (1973).
- BORCHARDT, R.T.: Mechanism of Alkaline Hydrolysis of S-Adenosyl-L-Methionine and Related Sulfonium Nucleosides.
J.Amer.Chem.Soc. 101, 458-463, (1979).
- BORCHARDT, R.T.: Catechol-O-Methyltransferase
In: Methods in Enzymology. Jacoby, W.B.(ed.)
Academic Press, New York 77, 267-272, (1981).
- BORKOWSKI, P.R.; HORN, J.S.; RAPOPORT, H.: Role of 1,2-Dehydroreticulium Ion in the Biosynthetic Conversion of Reticuline to Thebain.
J.Amer.Chem.Soc. 100, 276-281, (1978).
- BRADFORD, M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.
Anal.Biochem. 72, 248-254, (1976).
- BRITTON, D.R.; RIVIER, C.; SHIER, T.; VALE, W.; BLOOM, F.:
In-vivo and in-vitro Effects of Tetrahydroisoquinolines and Other Alkaloids on Rat Pituitary Function.
Biochem.Pharmacol. 31, 1205-1211, (1982).
- BROCHMANN-HANSEN, E.; CHEN, C.H.; CHEN, R.; CHIANG, H.C.; LEUNG, A.Y.; McMURTREY, K.: The Biosynthesis of 1-Benzylisoquinolines in Papaver somniferum. Preferred and Secondary Pathways; Stereochemical Aspects.
J.Chem.Soc.Perkin I 1975, 1531-1537.
- BROSSI, A.; RICE, K.C.; MAK, C.P.; REDEN, J.; JAKOBSON, A.; NIMITKITPAISAN, Y.; SKOLNIK, P.; DALY, J.:
Mammalian Alkaloids. 8. Synthesis and Biological Effects of Tetrahydropapaverolin Related 1-Benzyltetrahydroisoquinolines.
J.Med.Chem. 23, 648-652, (1980).

- CASSELS, B.K.; BREITMAIER, E.; ZENK, M.H.: Bisbenzylisoquinoline Alkaloids in *Berberis* Cell Cultures. *Phytochemistry* 26, 1005-1008, (1987).
- CHOU, T.C.; LOMBARDINI, J.B.: A Rapid Assay Procedure for ATP: L-Methionine Adenosyltransferase. *Biochem.Biophys.Acta* 276, 399-406, (1972).
- COLLINS, M.A.: Mammalian Alkaloids. In: *The Alkaloids*. Brossi, A. (ed.) Academic Press, New York 21, 329-358, (1983).
- CORDELL, G.A.: Introduction to Alkaloids. John Wiley & Sons, New York, (1981).
- CORNFORTH, J.W.; REDMOND, J.W.; EGGERER, H.; BUCKEL, W.; GUTSCHOW, C.: Asymmetric Methyl Groups and the Mechanism of Malat Synthase. *Nature* 221, 1212-1213, (1969).
- CORNFORTH, J.W.; REDMOND, J.W.; EGGERER, H.; BUCKEL, W.; GUTSCHOW, C.: Synthesis and Configurational Assay of Asymmetric Methyl Groups. *Eur.J.Biochem.* 14, 1-13, (1970).
- COWARD, J.K.; SLISZ, E.P.; WU, F.Y.H.: Kinetic Studies on Catechol-O-Methyltransferase. Product Inhibition of the Catechol Binding Site. *Biochemistry* 12, 2291-2297, (1973).
- CREASON, G.L.; MADISON, G.T.; THOMPSON, J.F.: Soybeans and Radish Leaves Contain Only One of the Sulfonium Diastereomers of S-Adenosylmethionin. *Phytochemistry* 24, 1151-1155, (1985).
- De la HABA, G.; JAMIESON, G.A.; MUDD, S.H.; RICHARDS, H.H.: S-Adenosylmethionin: The Relation of Configuration at the Sulfonium Centre to Enzymatic Reactivity. *J.Amer.Chem.Soc.* 81, 3975-3980, (1959).
- DIXON, M.: The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochem.J.* 55, 170-171, (1953).
- FLOSS, H.G.; TSAI, M.D.: Chiral Methyl Groups. *Adv.Enzymol.* 50, 243-302, (1979).
- GALNEDER, E.: Reinigung und Charakterisierung der Berberin Synthase aus Zellsuspensionskulturen von *Berberis stolonifera* V29. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, (1986).
- GREENE, R.C.: Kinetic Studies of the Mechanism of S-Adenosylmethionin Synthetase from Yeast. *Biochemistry* 8, 2255-2265, (1969).

- GROSS, A.; GERESH, S; WHITESIDES, G.M.: Enzymatic Synthesis of S-Adenosyl-L-Methionine from L-Methionine and ATP. *Appl.Biochem.Biotech.* 8, 415-422, (1983).
- GUPTA, R.N.; SPENSER, I.D.: Biosynthetic Incorporation of One-Carbon Units into Berberine and Hydrastine. *Can.J.Chem.* 43, 133-144, (1965).
- HANES, C.S.: The Effect of Starch Concentration upon the Velocity of Hydrolysis by the Amylase of Germinated Barley. *Biochem.J.* 26, 1406-1421, (1932).
- HEGAZI, M.F.; BORCHARDT, R.T.; SCHOWEN, R.L.: α -Deuterium and Carbon-13 Isotope Effects for Methyl Transfer Catalyzed by Catechol-O-Methyltransferase. S_N2 -Like Transition State. *J.Amer.Chem.Soc.* 101, 4359-4365, (1979).
- HINZ, H.; ZENK, M.H.: Produktion of Protoberberin Alkaloids by Cell Suspensions Cultures of *Berberis* Species. *Naturwissenschaften* 67, 620, (1981).
- HODGES, C.C.; RAPOPORT, H.: Enzymatic Conversion of Reticuline to Salutaridine by Cell-free Systems of *Papaver somniferum*. *Biochemistry* 21, 1671-1675, (1982).
- HOLLAND, H.; JEFFS, P.; CAPPS, T.M.; MacLEAN, D.B.: The Biosynthesis of Protoberberine and Related Isoquinoline Alkaloids. *Can.J.Chem.* 57, 1588-1597, (1979).
- HOUCK, D.R.; KOBAYASHI, K.; WILLIAMSON, J.M.; FLOSS, H.G.: Stereochemistry of Methylation in Thienamycin Biosynthesis: Example of a Methyl transfer from Methionine with Retention of Configuration. *J.Amer.Chem.Soc.* 108, 5365-5366, (1986).
- IBRAHIM, R.K.; DeLUCA, V.; KHOURI, H.; LATCHINIAN, L.; BRISSON, L.; CHAREST, P.M.: Enzymology and Compartmentation of Polymethylated Flavonol Glucosides in *Chrysosplenium americanum*. *Phytochemistry* 26, 1237-1245, (1987).
- IZZO, P.; GANTT, R.: Partial Purification and Characterization of N^2 -Guanine RNA Methyltransferase from Chicken Embryos. *Biochemistry* 16, 3576-3581, (1977).
- KAPADIA, G.J.; RAO, G.S.; LEETE, E.; FAYEZ, M.; VAISHNAV, Y.; FALES, H.: On the Origin of Carbon 1 in Tetrahydroisoquinoline Alkaloids. *J.Amer.Chem.Soc.* 92, 6943-6951, (1970).

- KARTNIG, T.: Cardiac Glycosides in Cell Cultures of Digitalis.
In: Plant Tissue Culture and its Biotechnological
Application. Barž, W.; Reinhard, E.; Zenk, M.H. (eds.)
Springer Verlag, Berlin 44-51, (1977).
- KIMURA, J; KIMURA, M; YOSHIZAKI, M; YANADA, K; KADOTA, S;
KIKUCHI, T.: Neuromuscular Blocking Action of
Alkaloids from a Japanese Crude Drug "Shin-I" (Flos
Magnoliae) in Frog Skeletal Muscle.
Planta Med **48**, 43-47, (1983).
- KLEINSCHMIDT, G.; MOTHES, K.: Zur Physiologie und Biosynthese
der Alkaloide von Papaver somniferum.
Z.Naturforsch. **14 b**, 52-56, (1959).
- KLIBANOV, A.M.: Enzyme Stabilization by Immobilization.
Anal.Biochem. **93**, 1-25, (1979).
- KOBAYASHI, M.; FRENZEL, T.; LEE, J.P.; ZENK, M.H.; FLOSS, H.G.:
Stereochemical Fate of O-Methyl Groups in the
Biosynthesis of Protoberberine Alkaloids.
J.Amer.Chem.Soc. im Druck (1987).
- KOSHIBA, T.: Purification of Two Forms of the Associated
3-Dehydroquinase Hydrolase and Shikimate: NADP⁺
Oxidoreductase in Phaseolus mungo Seedlings.
Biochim.Biophys.Acta **522**, 10-18, (1978).
- KOSUGE, T; MASAMI, Y; MICHIO, N.: Studies on Cardiac Principles
in Aconite Roots. I. Isolation and Structural Determina-
tion of Higenamine.
Yakugaku Zasshi (jap.) **98**, 1370-1375, (1978).
Chem.Abstr. **90**-76453.
- KOSUGE, T.; YOKOTA, M.: Studies on Cardiac Principle of Aconite
Root.
Chem.Pharm.Bull. (Tokyo) **24**, 176-178, (1976).
- LAMBERT, J.M.; COGGINS, J.R.; BOOCOCK, M.R.: The 3-Dehydroqui-
nase Synthase Activity of the Pentafunctional Arom-
Enzyme Complex of Neurospora crassa is Zn²⁺-dependent.
Biochem.J. **226**, 817-829, (1985).
- LENZ, H.; EGGERER, H.: Enzymic Generation of Chiral Acetates. A
Quantitative Evaluation of their Configurational Assay.
Eur.J.Biochem. **65**, 237-246. (1976).
- LILLY, M.D.; DUNNHILL, P.: Immobilized-Enzyme Reactors.
In: Methods in Enzymology. Mosbach, K.(ed.)
Academic Press, New York **44**, 717-738, (1976).
- LIN, L.Z.; WAGNER, H.; SELIGMANN, O.: Thalifaberin, Thalifabine
and Huangshanine, Three New Dimeric Aporphine-Benzyliso-
quinoline Alkaloids.
Planta Med. **49**, 55-64, (1983).

- LINDNER, E.: Structure Activities and Pharmacological Properties of the Opium Alkaloids.
In: The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. Philipson, D; Roberts, M.F.; Zenk, M.H. (eds.) Springer, Berlin 38-46, (1985).
- LINSMAIER, E.M.; SKOOK, F.: Organic Growth Factors Requirements of Tobacco Tissue Cultures.
Physiol.Plant 18, 110-125, (1965).
- LÖFFLER, S.; STADLER, R.; NAGAKURA, N.; ZENK, M.H.: Norcoclaurine as Biosynthetic Precursor of Thebain and Morphine.
J.Chem.Soc.Chem.Comm. im Druck, (1987).
- LUCKNER, M.; DIETRICH, B.: Die Regulation des Sekundärstoffwechsels.
In: Biogene Arzneistoffe. Czygan F.C. (ed.) Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig 45-60, (1984).
- LÜTHY, J.; RETEY, J.; ARIGONI, D.: Preparation and Detection of Chiral Methyl Groups.
Nature 226, 1213-1215, (1969).
- MARKERT, C.L.; WHITT, G.S.: Molecular Varieties of Isoenzymes.
Experientia 24, 977-991, (1968).
- MARKHAM, G.D.; HAFNER, E.W.; TABOR, C.W.; TABOR, H.: S-Adenosylmethionin Synthetase from Escherichia coli.
J.Biol.Chem. 255, 9082-9092, (1980).
- MARKHAM, G.D.; DePARASIS, J.; GATMAITAN, J.: The Sequence of metK, the Structural Gene for S-Adenosylmethionine Synthetase in Escherichia coli.
J.Biol.Chem. 259, 14505-14507, (1984).
- MARKHAM, G.D.: Structure of the Divalent Metal Activator Binding Site of S-Adenosylmethionine Synthetase Studied by Vanadyl (IV) Electron Paramagnetic Resonance.
Biochemistry 23, 470-478, (1984).
- MARTINEK, K.; KLIBANOV, A.M.; GOLDMACHER, V.S.; BEREZIN, I.V.: The Principles of Enzyme Stabilization I. Increase in Thermostability of Enzymes Covalently Bound to a Complementary Surface of a Polymer Support in a Multipoint Fashion.
Biochim.Biophys.Acta 485, 1-12, (1977).
- MAUGH, T.H.: A Renewed Interest in Immobilized Enzymes.
Science 223, 474-475, (1984).
- MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese.
Walter De Gruyter Verlag, Berlin (1968).

- MAW, G.A.: The Biochemistry of Sulphonium Salts
In: The Chemistry of the Sulphonium Group. Part 2
Sterling, C.J.M. (ed.).
John Wiley & Sons, New York 704-770, (1981).
- MOTHES, K.; Zur Wissenschaftsgeschichte der biogenen Arznei-
stoffe.
In: Biogene Arzneistoffe. Czygan F.C. (ed.)
Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig 5-26, (1984).
- MÜMMLER, S.; RÜFFER, M.; NAGAKURA, N.; ZENK, M.H.:
S-Adenosyl-L-Methionine: (S)-Scoulerin-9-O-Methyltrans-
ferase, a Highly Stereo- and Regiospecific Enzyme in
Tetrahydropapaverberin Biosynthesis.
Plant Cell Rep. 4, 36-39, (1985).
- MUTSCHLER, E.: Arzneimittelwirkungen.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1981).
- MYERS, R.D.; MELCHIOR, C.: Alcohol Drinking: Abnormal Intake
Caused by Tetrahydropapaveroline in Brain.
Science 196, 554-555, (1977).
- NIMIT, Y.; SCHULZE, J.; CASHAW, J.L.; DAVIS, V.E.; RUCHIRAVAT, S.:
Interaction of Catecholamine-derived Alkaloids With
Central Neurotransmitter Receptors.
J.Neurosci.Res. 10, 175-189, (1983).
- NIMITKITPAISAN, Y.; SKOLNICK, P.: Catecholamine Receptors and
Cyclic-AMP Formation in the Central Nervous System:
Effects of Tetrahydroisoquinolin Derivatives.
Life Sci. 23, 375-382, (1978).
- NOTT, M.W.; HEAD, G.A.: Actions of Tetrahydropapaveroline on
the Cardio Vascular System and Skeletal Muscles of the
Anesthetized Cat and on Guinea Pig Soleus Muscle in
Vitro.
Clin.Exp.Pharmacol.Physiol. 5, 313-323, (1978).
- PARKS, L.W.; SCHLENK, F.: The Stability and Hydrolysis of S-
Adenosylmethionine; Isolation of S-Ribosylmethionine.
J.Biol.Chem. 230, 295-305, (1958).
- PAUL, A.G.: Biosynthesis of the Peyote Alkaloids.
Lloydia 36, 36-45, (1973).
- PFITZNER, U.: Die Strictosidin-Synthase aus Catharanthus roseus
Zellkulturen: Reinigung, Immunologische Charakterisie-
rung und Immobilisierung eines Enzyms aus dem Sekundär-
stoffwechsel.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München,
(1984).
- PHARMAZEUTISCHE STOFFLISTE Arzneibüro der ABDA, Frankfurt.

- PICTET, A.; SPENGLER, T.: Über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirken von Methylal auf Phenyläthylamin, Phenylalanin und Tyrosin.
Chem.Ber. 44, 2030-2036, (1911).
- POLLEY, L.D.: Purification and Characterization of 3-Dehydro-quininate Hydrolase and Shikimate Oxidoreductase. Evidence for a Bifunctional Enzyme.
Biochim.Biophys.Acta 526, 259-266, (1978).
- PREININGER, V.: The Pharmacology and Toxicology of the Papaveraceae Alkaloids.
In: The Alkaloids. Manske, R.H.F. (ed.) Academic Press, New York 15, 207-261, (1975).
- RÜFFER, M.; EL-SHAGI, H.; NAGAKURA, N.; ZENK, M.H.:
(S)-Norlaudanosoline Synthase: The First Enzyme in the Benzylisoquinoline Biosynthetic Pathway.
FEBS Lett. 129, 5-9, (1981).
- RÜFFER, M.; NAGAKURA, N.; ZENK, M.H.: Partial Purification and Properties of S-Adenosylmethionin: (R),(S)-Norlaudanosoline-6-O-Methyltransferase from Argemone platyceras Cell Cultures.
Planta Med. 49, 131-137, (1983a).
- RÜFFER, M.; EKUNDAYO, O.; ZENK, M.H.: Biosynthesis of the Protoberberine Alkaloid Jatrorrhizine.
Tetrahedron Lett. 24, 2643-2644, (1983b).
- RÜFFER, M.; NAGAKURA, N.; ZENK, M.H.: A Highly Specific O-Methyltransferase for Nororientaline Synthesis Isolated from Argemone platyceras Cell Culture.
Planta Med. 49, 196-198, (1983c).
- RÜFFER, M.: The Production of Isoquinoline Alkaloids by Plant Cell Cultures.
In: The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. Philipson, D; Roberts, M.F.; Zenk, M.H. (eds.) Springer, Berlin 265-280, (1985).
- RÜFFER, M.; ZENK, M.H.: Berberine Synthase, the Methylenedioxy Group Forming Enzyme in Berberine Synthesis.
Tetrahedron Lett. 26, 201-202, (1985).
- RÜFFER, M.; ZENK, M.H.: Distant Precursors of Benzylisoquinoline Alkaloids and their Enzymatic Formation.
Z.Naturforsch. 42 c, 319-332, (1987).
- SAINT-GIRONS, I.; BELFAIZA, J.; GUILLOU, Y.; PERRIN, D.; GUIISO, N.; BARZU, O.; COHEN, G.N.: Interactions of the E.coli Methionine Repressor With the metF Operator and With its Corepressor, S-Adenosylmethionine.
J.Biol.Chem. 261, 10936-10940, (1986).

- SANDLER, M.; CARTER, S.B.; HUNTER, K.R.; STERN, G.M.:
Tetrahydroisoquinoline Alkaloids: in-vivo Metabolites of
L-Dopa.
Nature 241, 439-443, (1973).
- SANTAVY, F.: Papaveraceae Alkaloids II.
In: The Alkaloids. Manske, R.H.F. (ed.) Academic Press,
New York 17, 385-519, (1975).
- SATO, M.; IKEZAWA, K.; NAGAO, T.: Bronchodilatating Action of
Trimethoquinol and its Selectivity to Bronchial Adreno-
ceptors in Anesthetized Dogs and Cats.
Oyo Yakuri (jap.) 19, 269-276, (1980).
Chem.Abstr. 93-107047.
- SCHUMACHER, H.M.; RÜFFER, M.; NGAKURA, N.; ZENK, M.H.:
Partial Purification and Properties of (S)-Norlaudano-
solin Synthase from Eschscholtzia tenuifolia Cell
Cultures.
Planta Med. 48, 212-220, (1983).
- SCOTT, A.J.: The Early Stages of Papaver Alkaloid Biosynthesis.
Cell-Free Synthesis of Benzylisoquinolines.
Heterocycles 11, 159-163, (1978).
- SHAMMA, M.: The Isoquinoline Alkaloids.
Academic Press, New York (1972).
- SHAMMA, M.; HINDENLANG, D.M.: Carbon-13 NMR Shift Assignments of
Amines and Alkaloids.
Plenum Press, New York, (1979).
- SHARMA, S.K.; BROWN, S.A.: Affinity Chromatography on Immo-
bilized S-Adenosyl-L-Homocysteine. Purification of a Fura-
nocumarine O-Methyltransferase from Cell Cultures of
Ruta graveolens.
J.Chromatography 157, 427-431, (1978).
- SHEPPARD, H.; BURGHARDT, C.R.; TEITEL, S.: A Structure-Activity
Analysis of the Preferred Conformation of the Benzylsub-
stituent of Tetrahydropapaveroline at the Beta Receptor.
Res.Communic.Chem.Pathol.Pharmacol. 17, 53-60, (1977).
- SPENSER, I.D.: Biosynthesis of the Alkaloids Related to Norlau-
danosolin.
Lloydia 29, 71-89, (1966).
- STADLER, R.: Die Biosynthese der Bisbenzylisochinolin-Alkaloide
in Berberis stolonifera Zellkulturen.
Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München,
(1986).

- STADLER, R.; KUTCHAN, T.M.; LÖFFLER, S.; NAGAKURA, N.; CASSELS, B.; ZENK, M.H.: Revision of the Early Steps of Reticuline Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 28, 1251-1254, (1987).
- STEFFENS, P.: Reinigung und Charakterisierung des Berberinbrückenzyms aus Zellkulturen von *Berberis beaniana* Schneid. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, (1984).
- STRYER, L.: Biochemie. Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig, (1979).
- SU, C.H.; GREENE, R.C.: Regulation of Methionine Biosynthesis in *Escherichia coli*: Mapping of the metJ Locus and Properties of a metJ⁺/metJ⁻ Diploid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.* 68, 367-371, (1971).
- TABOR, C.W.; TABOR, H.: Methionine-Adenosyltransferase and SAM-Decarboxylase. *Adv.Enzymology* 56, 251-282, (1984).
- TAYLOR, R.T.; WEISSBACH, H.: N⁵-Methyltetrahydrofolate-Homocystein Methyltransferase. In: *The Enzymes*. Boyer, P.D. (ed) Academic Press, New York 9, 121-166, (1973).
- TUROVA, A.D.; KONOVALOV, M.N.; LESKOV, A.I.: Berberin, an Effective Cholagogue. *Med.Prom.SSSR (russ.)* 18, 59, (1964). *Chem.Abstr.* 61-15242 f.
- WAGNER, H.; REITER, M.; FERSTL, W.: New Drugs With Cardiotonic Activity. I. Chemistry and Pharmacology of the Cardiotonic Active Principle of *Annona squamosa*. *Planta Med.* 40, 77-85, (1985).
- WAT, C.K.; STEFFENS, P.; ZENK, M.H.: Partial Purification and Characterization of S-Adenosylmethionine: Norreticuline-N-Methyltransferase from *Berberis* Cell Suspension Culture. *Z.Naturforsch.* 41 c, 126-134, (1986).
- WEETALL, H.H.: Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. In: *Methods in Enzymology*. Mosbach, K. (ed.) Academic Press, New York 44, 134-147, (1976).
- WEETALL, H.H.; PITCHER, W.H.: Scaling Up an Immobilized Enzyme System. *Science* 232, 1396-1403, (1986).
- WHITESIDES, G.M.; WONG, C.H.: Enzyme in der organischen Synthese. *Angewandte Chemie* 97, 617-638, (1985).

- WIECZOREK, U.: Entwicklung radioimmunologischer Methoden zur Bestimmung von Opium Alkaloiden in Papaver-Pflanzen und Zellkulturen.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, (1985).
- WINTERSTEIN, E.; TRIER, G.: Die Alkaloide.
Bornträger, Berlin (1910).
- WOODARD, R.W.; MASCARO, L.; HÖRHAMMER, R.; EISENSTEIN, S.; FLOSS, H.G.: Stereochemistry of Indolmycin Biosynthesis.
Steric Course of C- and N-Methylation Reactions.
J.Amer.Chem.Soc. 102, 6314-6318, (1980a).
- WOODARD, R.W.; TSAI, M.D.; FLOSS, H.G.; CROOKS, P.A.; COWARD, J.K.: Stereochemical Course of the Transmethylation Catalyzed by Catechol-O-Methyltransferase.
J.Biol.Chem. 255, 9124-9127, (1980b).
- WRINGLEY, C.W.: Gel Electrofocussing.
In: Methods in Enzymology. Jacoby, W.B.(ed.)
Academic Press, New York 22, 559-564, (1971).
- WU, S.E.; HUSKEY, P.; BORCHARDT, R.T.; SCHOWEN, R.L.: Chiral Instability at Sulfur of S-Adenosylmethionine.
Biochemistry, 22, 2828-2832, (1983).
- ZAPPIA, V.; ZYDEK-CWICK, C.R.; SCHLENK, F.: The Specifity of S-Adenosylmethionine Derivatives in Methyl Transfer Reactions.
J.Biol.Chem. 244, 4499-4509, (1969).
- ZENK, M.H.: Enzymology of Benzylisoquinoline Alkaloid Formation.
In: The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. Philipson, D; Roberts, M.F.; Zenk, M.H. (eds.)
Springer, Berlin 240-256, (1985).
- ZENK, M.H.; RÜFFER, M.; AMANN, M.; DEUS-NEUMANN, B.; NAGAKURA, N.: Benzylisoquinoline Biosynthesis by Cultivated Plant Cells and Isolated Enzymes.
J.Nat.Prod. 48, 725-738, (1985).
- ZHENG, X.Z.; WU, F.H.: Antiasthmatic Effect of the Active Principle of Gnetum parvifolium and its Mechanism of Action.
Chung Ts'ao Yao (chin.) 12, 30-32, (1982).
Chem.Abstr. 95-125979.
- ZYDOWSKY, T.M.; CURNEY, L.F.; FRASCA, V.; KOBAYASHI, K.; SHIMIZU, H.; YUEN, L.D.; MATTHEWS, R.G.; BENKOVIC, S.J.; FLOSS, H.G.: Stereochemical Analysis of the Methyl Transfer Catalyzed by Cobalamin-Dependent Methionine Synthase from *E.coli*.
J.Amer.Chem.Soc. 108, 3152-3153, (1986).

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. M.H. Zenk möchte ich sehr herzlich für die Anregung zur Bearbeitung des vorliegenden Themas danken. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen hatten wesentlichen Anteil am Gelingen der Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. H.G. Floss, Columbus, für die Anregung einer Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Untersuchungen mit chiralen Methylgruppen und die lehrreichen Diskussionen zu diesem Themenkomplex. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die Gewährung eines kurzen Aufenthaltes in seinem Arbeitskreis und die dabei erfahrene Gastfreundschaft.

Vor allem möchte ich aber auch meinen Kollegen für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft danken, die sie mir die ganze Zeit entgegengebracht haben, und die der Grundstein für das Gelingen dieser Arbeit war.

LEBENS LAUF

Name: Thomas Frenzel

Geburtstag: 11.11.57

Geburtsort: München

Eltern: Alfred Frenzel, Dr. Dipl.Ing.
Ortrun Frenzel, geb. Rother

Schul Ausbildung: 1964-1968, Volksschule Kirchseeon
1968-1977, Gymnasium Grafing
Juni 1977, Abitur

Wehrdienst: 1977-1978

Berufsausbildung: Nov. 1978 - April 1982, Pharmaziestudium
an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
April 1982, 2. pharmazeutisches Staatsexamen
Mai 1982 - Juni 1983 Pharmaziepraktikum in
einer öffentlichen Apotheke
Juni 1983, 3. pharmazeutisches Staatsexamen
und Approbation als Apotheker

Ab Sept. 1983, Anfertigen der vorliegenden
Dissertation unter Anleitung von Prof.
Dr. M.H.Zenk

Berufstätigkeit: Seit Sept. 1983 als wissenschaftliche Hilfskraft
am Institut für Pharmazeutische Biologie

